

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



TESIS DOCTORAL

**Papel del sistema cannabinoide en la respuesta glial al
depósito del péptido beta-amiloide**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

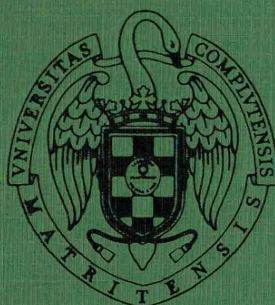
Estefanía Núñez Sánchez

DIRECTORES:

Julián Romero Paredes
Rosa María Tolón Rafael

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PAPEL DEL SISTEMA CANNABINOIDE
EN LA RESPUESTA GLIAL AL DEPÓSITO
DEL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE

TESIS DOCTORAL

ESTEFANÍA NÚÑEZ SÁNCHEZ

Madrid, 2008



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5324993909

NUA

P-P

*St Josefa, Papi, José Luis, Nacho,
Genovera y Rafael*



RL3698758x

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Luis y Pepi, por su apoyo incondicional y paciencia en todos los momentos, por difíciles que fueran; y al resto de mi familia, por estar siempre a mi lado.

A Nacho, por su gran ayuda y paciencia.

A mis amigas Sara, Graci, Eva y Olga, por estar a mi lado y haberme animado durante todos estos años.

A mis directores de tesis, Rosa y Julián. A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Ruth, Montse, Cristina, Laura, Maite y Fernando, y en especial a Ruth y Montse por saber escuchar en todo momento y sus buenos consejos. A Juan Pablo, por su apoyo durante su estancia en nuestro laboratorio. A Pepe, por su colaboración en el diseño de algunos experimentos y sus grandes conocimientos de estadística.

Al laboratorio de la Dra. Sue Griffin, en la Universidad de Arkansas, por su calurosa acogida y valiosas enseñanzas durante mi estancia en dicho laboratorio, y en especial a Sue Woodward y Richard Jones por su ayuda con las técnicas y las muestras. A Angela, del VA Hospital de la Universidad de Arkansas, por su amistad durante mi estancia en el laboratorio de la Dra. Griffin.

Al laboratorio de la Dra. Lidia Jiménez Llorca, de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su ayuda durante mi breve estancia allí y el mantenimiento de las colonias de ratones transgénicos de Alzheimer.

Al laboratorio de los Dres. Javier Fernández-Ruiz y José Antonio Ramos, de la Universidad Complutense de Madrid, y en especial a María, Eva y Onintza.

Al laboratorio de Manuel Guzmán, en la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda con los cultivos celulares, y en especial a Cristina Blázquez.

Al laboratorio de Jesús Vázquez, en el CMBSO, por todo su apoyo durante la última etapa de la tesis, y en especial a Jesús y a Pablo.

ABREVIATURAS

SCE	Sistema Cannabinoide Endógeno
SNC	Sistema Nervioso Central
Δ^9-THC	Delta-9-tetrahidrocannabinol
AEA	Anandamida
2-AG	2-araquidonoilglicerol
FAAH	Enzima amido hidrolasa de ácidos grasos
ACEA	Araquidonil-2-cloretíl amida
ACPA	Araquidonilciclopropil amida
Δ^8-THC	Delta-8-tetrahidrocannabinol
CBN	Cannabinol
CBD	Cannabidiol
TPRV₁	Receptores vanilloides dependientes de voltaje 1
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
FAK	Quinasa de adhesión focal
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
sEPSPs	Potenciales excitatorios postsinápticos glutamatérgicos
SR₁	SR144716A
SR₂	SR144528
PI3K/PKB	Quinasas fosfatidil inositol trifosfato/Proteína quinasa B
cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
AA	Ácido araquidónico
DAG	Diacilglicerol
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLD	Fosfolipasa D
PKC	Proteína quinasa C
CREB/ATF	Factores del elemento de respuesta de unión a AMPc/Factor autotumorolítico

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
NK	<i>Natural killer</i>
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
abn-CBD	Abnormal-Cannabidiol
NO	Óxido nítrico
PEA	Palmitoiletanolamida
IL-1	Interleuquina-1
TNF	Factor de necrosis tumoral
PE	N-araquidonoil fosfatidiletanolamina
TAMs	Transportadores de membrana de la anandamida
COX-2	Ciclooxigenasa-2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
IL-6	Interleuquina-6
CHI	Trauma cerebral cerrado
ICF	Isquemia cerebral focal
OGD	Deprivación de oxígeno y glucosa
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
LPS	Lipopolisacárido
VIH	Virus de la inmunodeficiencia en humanos
VIS	Virus de la inmunodeficiencia en simios
EA	Enfermedad de Alzheimer
APP	Proteína precursora amiloide
PHFs	Filamentos helicoidales pareados
GSK	Glucoquinasa sintasa
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
ApoE	Apolipoproteína E
NOS3	Óxido nítrico sintasa 3
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos

ABREVIATURAS

SD	Síndrome de Down
SOD-1	Superóxido dismutasa 1
BTIN	Banco de tejidos para la Investigación Neurológica
CERAD	Consorcio para establecer registro de la EA
KPBS	Buffer fosfato salino potásico
DAB	Diaminobencidina
TBS	Tris buffer salino
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
FBS	Suero fetal bovino
LDH	Lactato deshidrogenasa

INTRODUCCIÓN

	Páginas
1.- Aspectos generales	1
2.- Química de los cannabinoides	4
2.1.- Derivados de la planta	4
2.2.- Derivados de síntesis	5
2.3.- Endocannabinoides	5
3.- Otras herramientas farmacológicas para el estudio de los receptores cannabinoides	6
3.1.- Inhibidores del metabolismo de endocannabinoides	6
3.2.- Agonistas cannabinoides	8
3.3.- Antagonistas cannabinoides	9
4.- Receptores de cannabinoides	10
4.1.- Aspectos generales	10
4.2.- Receptores CB1	11
4.2.1.- Distribución	11
4.2.2.- Mecanismos de transducción de señales	14
4.2.3.- Funciones	17
4.3.- Receptores CB2	24
4.3.1.- Distribución	24
4.3.2.- Mecanismos de transducción de señales	25
4.3.3.- Funciones	25
4.4.- Otros receptores de cannabinoides	28
4.4.1.- Receptores en neuronas	28
4.4.2.- Receptores en vasos sanguíneos	29
4.4.3.- Receptores en células inmunes	30
4.4.4.- Receptor GPR55	30
5.- Endocannabinoides	31
5.1.- Síntesis de AEA	31
5.2.- Síntesis de 2-AG	33
6.- Sistema de inactivación de endocannabinoides	34
6.1.- Transportador de membrana	34
6.2.- Enzimas de degradación	35
6.2.1.- FAAH	35
6.2.2.- Otras enzimas de degradación	36
7.- Sistema Cannabinoide Endógeno y patología del SNC	37
7.1.- Trauma cerebral cerrado	37
7.2.- Hipoxia-isquemia	38
7.3.- Enfermedad de Huntington	41
7.4.- Enfermedad de Parkinson	44
7.5.- Esclerosis múltiple	47

	Páginas
7.6.- Esclerosis lateral amiotrófica	48
7.7.- Neuroinflamación por infección bacteriana o viral	49
8.- Enfermedad de Alzheimer	52
8.1.- Aspectos generales	52
8.2.- Neuropatología	52
8.3.- Aspectos genéticos	56
8.4.- Procesos neuroinflamatorios asociados	58
8.5.- Modelos transgénicos	62
9.- Sistema cannabinoide y enfermedad de Alzheimer	63
10.- Síndrome de Down	64
10.1.- Aspectos fisiopatológicos	64
10.2.- Modelos animales	66
OBJETIVOS	69
MATERIAL Y MÉTODOS	
1.- Muestras	70
2.- Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	72
3.- Western blot	76
4.- Medida de la actividad de la FAAH	77
5.- RT-PCR	77
6.- Cultivos celulares	81
7.- Cuantificación de las placas del péptido beta-amiloide	83
RESULTADOS	
1.- Localización del SCE en cerebro humano	84
1.1.- Receptores CB1	84
1.2.- Receptores CB2	85
1.3.- FAAH	86
2.- Localización del SCE en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer	95
2.1.- Receptores CB1	95
2.2.- Receptores CB2	96
2.3.- FAAH	97
3.- Localización del SCE en el cerebro de un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer	105
4.- Localización del SCE en el cerebro de pacientes con Síndrome de Down	109
4.1.- Receptores CB1	109
4.2.- Receptores CB2	110
4.3.- FAAH	110

INTRODUCCIÓN

El *Cannabis sativa* se cultiva desde la antigüedad. Las primeras evidencias sobre su uso se encontraron en China, donde los descubrimientos arqueológicos evidencian que la planta se cultivaba desde el año 4000 AC. La cultura china no sólo empleaba las fibras obtenidas del tallo de la planta para hacer cuerdas, ropas e incluso papel, sino que también ha sido usada para el tratamiento de algunas enfermedades como el dolor reumático, la malaria o los trastornos del aparato reproductor femenino (Li y cols., 1974).

También, en la India, los preparados a partir de la planta se utilizaban tanto con fines medicinales como recreacionales en el año 1000 AC. Se usaba como analgésico, anticonvulsivante, anestésico, anti-inflamatorio, antiparasitario, antiespasmódico, diurético, estimulante del apetito, antitusivo, expectorante y afrodisíaco (Mikuriya, 1969; Aldrich, 1997).

Los progresivos avances en las investigaciones médicas y farmacéuticas, así como el desarrollo de medicamentos más específicos y efectivos, para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas, junto con las numerosas restricciones legales que limitaban su uso y su experimentación, influyeron en la disminución del uso del cannabis como medicina (Fankhauser, 2002). A mediados del siglo XX el interés científico por dichas sustancias fue aumentando paulatinamente debido al incremento en el consumo de cannabis y al mejor conocimiento de su composición química (Russo, 2006).

El componente principal de la marihuana, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) fue identificado hace más de 40 años (Gaoni y Mechoulam, 1964; Grunfel y Edery, 1969; Mechoulam y cols., 1970). Posteriormente, se comprobó que este compuesto, junto con otros también presentes en la planta, eran responsables de los efectos psicoactivos de los derivados de la planta (Dewey, 1986; Hollister, 1986). Las características hidrófobas de la molécula del THC invitaban a pensar en procesos de interacción a nivel de la membrana celular como la base molecular de los efectos de los cannabinoides. Gracias a la síntesis de

compuestos derivados de la estructura del THC, de mayor potencia y selectividad, se pudo llegar a identificar la presencia de una proteína receptora específica para los cannabinoides. Estos compuestos denominados cannabinoides “no clásicos” incluían entre otros el CP55,940 y el CP55,241. La disponibilidad de estos compuestos revolucionó el estudio de la actividad de los cannabinoides. El grupo de Howlett (1988) usó este tipo de compuestos en una línea celular de neuroblastoma para demostrar que producen la inhibición de la adenilato ciclasa. Posteriormente, este mismo grupo utilizó el compuesto CP55,940 tritiado para identificar y caracterizar el receptor de cannabinoides en membranas de cerebro de rata (Devane y cols., 1988).

Poco después de la caracterización molecular de los receptores CB₁, Munro y cols. (1993) describieron la existencia de un segundo receptor para compuestos cannabinoides, que no parecía expresarse en tejido cerebral.

El descubrimiento de los receptores de cannabinoides hizo pensar en la posible existencia de compuestos endógenos en el cerebro que actuaran como ligandos fisiológicos de los mismos, así como de mecanismos fisiológicos de producción e inactivación de dichos ligandos. El grupo de Mechoulam en Israel a partir de la fracción lipídica de cerebro porcino consiguió aislar y caracterizar el primer compuesto endógeno capaz de unirse y activar el receptor para cannabinoides, identificado como N-araquidonoil etanolamina o anandamida (AEA). Posteriormente, y en paralelo con el grupo de Sugiura también aisló e identificó el segundo de estos compuestos, el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). Estos dos compuestos fueron los primeros de una gran familia de moléculas endógenas capaces de unirse a los receptores de cannabinoides conocidos como endocannabinoides.

Los mecanismos de síntesis e inactivación de los endocannabinoides son bien conocidos en la actualidad. A día de hoy se sabe que los endocannabinoides

no se almacenan en vesículas, sino que son sintetizados y liberados en respuesta a estímulos apropiados a partir de moléculas precursoras localizadas en la membrana celular. Así mismo, los endocannabinoides son degradados por enzimas específicas tales como la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoglicérido lipasa (MGL) (Cravatt y cols., 1996).

En los últimos años se han desarrollado varias moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos cannabimiméticos mediados por los receptores de cannabinoides, que han supuesto una herramienta fundamental para la caracterización farmacológica de estas proteínas.

QUÍMICA DE LOS CANNABINOIDES

Los principales cannabinoides se pueden clasificar de acuerdo a la siguiente tabla:

ORIGEN DEL COMPUESTO	COMPUESTOS
CANNABINOIDES VEGETALES (Derivados del <i>Cannabis sativa</i>)	Δ^9 -THC, cannabidiol, cannabinol, cannabigerol, cannabicromeno, cannabicitrol
CANNABINOIDES SINTÉTICOS <ul style="list-style-type: none"> • Análogos de los cannabinoides clásicos • Análogos de la pravadolina (aminoalquilindoles) • Agonistas selectivos CB₁ • Agonistas selectivos CB₂ 	CP 55940, HU 210 WIN 55212-2 ACEA, ACPA, O-1812, R-(+)-metanandamida HU 308, JWH133, JW-015, AM1241, L-759633, L-759656
CANNABINOIDES ENDÓGENOS (Endocannabinoides)	Araquidoniletanolamida (Anandamida-AEA), 2-AG, dihomog- γ -linoleniletanolamida, docosatetranoiletanolamida, N-araquidonildopamina, N-oleoildopamina, oleamida

1.- DERIVADOS DE LA PLANTA

Aunque la principal sustancia psicoactiva del cannabis es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), la planta contiene cerca de 60 cannabinoides, entre los cuales se encuentran el Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), el cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), cannabigerol, cannabicromeno y cannabicitrol. El Δ^9 -THC es el cannabinoide con mayor potencia psicoactiva y es

muy soluble en lípidos. Fue aislado de la planta *Cannabis sativa* por Gaoni y Mechoulam en 1964. Este compuesto es el principal responsable de los efectos farmacológicos del cannabis. El Δ^8 -THC sólo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es mucho menor que la del Δ^9 -THC. El CBN también presenta propiedades psicoactivas, mientras que el CBD es un fitocannabinoide no psicoactivo con propiedades anti-inflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas.

2.- DERIVADOS DE SÍNTESIS

Hasta 1990, todos los compuestos conocidos que actuaban como cannabimiméticos eran derivados estructurales del THC. La situación cambió con el descubrimiento de una nueva familia de compuestos con una gran afinidad por los receptores CB₁ (D'Ambra y cols., 1992; Eissenstat y cols., 1995). El CP55940 es un cannabinoide no clásico, que ha permitido el descubrimiento y la caracterización del receptor CB₁ (Devane y cols., 1988). Se trata de un compuesto menos lipofílico y más potente que el THC, y tiene una afinidad similar por ambos tipos de receptores cannabinoides. El WIN55212 pertenece a la familia de los aminoalquilindoles y posee los mismos efectos farmacológicos que el THC *in vivo*. También pertenecen a este grupo el JWH-015 y el L-768242, que son compuestos selectivos de receptores CB₂ (Gallant y cols., 1996; Shewolta y cols., 1996).

3.- ENDOCANNABINOIDES

Los endocannabinoides más investigados han sido la amida de ácidos grasos poli-insaturados, N-araquidonoiletanolamida (anandamida-AEA), y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG). La AEA tiene mayor afinidad por receptores CB₁ que por los CB₂, aunque la eficiencia de unión a ambos tipos de receptores cannabinoides es baja, comportándose como un agonista parcial. El 2-AG tiene una afinidad similar a la AEA por los receptores cannabinoides, aunque la eficacia con la que se une a los mismos es mayor que la de la AEA. Se sabe que,

tanto la AEA como el 2-AG, tienen efectos neuromoduladores e inmunomoduladores, y que pueden estar implicados en diversos procesos patológicos.

La N-araquidonoil dopamina es capaz de inducir antinocicepción en ratones a los que se les realiza el test de la placa caliente y de unirse a receptores vanilloides dependientes de voltaje tipo 1 (TPRV1). Su distribución en cerebro es distinta a la de la AEA (Bisogno y cols., 2000; Bradshaw y cols., 2005). La N-oleoil dopamina es un agonista de receptores TPRV1 y es capaz de inducir hiperalgesia frente a estímulos térmicos y alodinia (Bradshaw y cols., 2005). Por último, la oleamida es capaz de activar receptores CB₁, bloquear la comunicación intercelular a través de uniones gap, aumentar la ingesta de alimentos y regular el sueño (Leggett y cols., 2004; Bradshaw y cols., 2005).

Se ha observado que la AEA, y algunos análogos estructurales como la metanandamida, la araquidonil-2-cloroetilamida y el N-(4-hidroxibencil)araquidonoilamina (AM404), también pueden unirse a receptores TPRV1.

OTRAS HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE RECEPTORES CANNABINOIDES

1.- INHIBIDORES DEL METABOLISMO DE ENDOCANNABINOIDES

El descubrimiento de los mecanismos implicados en la inactivación de los cannabinoides ha potenciado el desarrollo de compuestos que son capaces de inhibir estos procesos. Algunos de estos inhibidores se han empleado como herramientas farmacológicas en experimentos con animales encaminados a mejorar el conocimiento del papel fisiológico y patológico de la liberación de anandamida y 2-AG. Entre estos inhibidores se encuentran compuestos como el

AM374, MAFP, DAK, URB532 , URB597 y OL-135 (inhibidores reversibles de FAAH), la N-araquidonil glicina y N-araquidonil serina (inhibidores del metabolismo de la AEA), y el AM404, VDM11, VDM13, OMDM-1, OMDM-2 y UCM707 (inhibidores de la recaptación de AEA). Sin embargo, no se han desarrollado compuestos capaces de inhibir la monoacilglicerol lipasa (MAGL) de forma potente y selectiva.

Los inhibidores de FAAH como el OL-135, URB532, URB597 y N-araquidonilglicina tienen propiedades anti-nociceptivas en varios modelos de dolor en roedores. También existen datos acerca de las propiedades anti-nociceptivas de inhibidores de la recaptación de AEA como el OMDM-2 y el VDM11 en el test de la placa caliente realizado en ratas (De Lago y cols., 2004). Los síntomas espásticos característicos de la esclerosis múltiple mejoran con el inhibidor de la FAAH, AM374, y con inhibidores de la recaptación de AEA como el AM404, VDM11, OMDM-1 y OMDM-2 en varios modelos murinos de la enfermedad (Baker y cols., 2001; De Lago y cols., 2004).

El AM404, el inhibidor del transportador de la AEA, potencia la acción de la AEA *in vivo* (Fegley y cols., 2004) y en secciones de hipocampo (Hajos y cols., 2004). El AM734, inhibidor de la FAAH, también produce un aumento de los niveles de endocannabinoides en células de neuroblastoma (Deutsch y cols., 1997). Ambos compuestos, por separado, activan las vías de la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa regulada por señales extracelulares/quinasas activadas por mitógenos (ERK/MAPK) en secciones de hipocampo en cultivo. Esta vía es muy importante para la supervivencia neuronal y el mantenimiento de la sinapsis (Bahr y cols., 2002; Marsicano y cols., 2003), por lo que se podría inferir que los cannabinoides protegen de la excitotoxicidad a través de ella. El efecto de estos dos compuestos es revertido por el antagonista CB₁, AM281.

A todo lo anterior debemos añadir que los inhibidores del metabolismo de la anandamida pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Al inhibir la recaptación de la anandamida, aumentan sus niveles y

su efecto inhibitorio sobre la liberación de glutamato en neuronas corticoestriatales (Gubellini y cols., 2002; Maccarrone y cols., 2003). Para comprobar esta hipótesis se han realizado diversos experimentos con un modelo de rata en el que, la inyección unilateral de 6-hidroxidopamina en una región cercana a la *substantia nigra*, destruye las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Daily y cols., 1999; Dodel y cols., 1999). En las regiones lesionadas se han observado mayores frecuencias de los potenciales excitatorios postsinápticos glutamatérgicos (sEPSPs) que en las secciones control. Las frecuencias disminuyen tras la administración de inhibidores de la FAAH, como el PMSF y el MAFP, o de inhibidores de la recaptación de anandamida, como el AM404 y el VDM11. El agonista selectivo de receptores CB₁, HU-210, tiene el mismo efecto que los inhibidores, y este efecto es revertido por el antagonista SR141716A.

2.- AGONISTAS CANNABINOIDES

Estos compuestos incluyen:

- Cannabinoides clásicos como el Δ^9 -THC, que es el principal componente psicoactivo del cannabis y un agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂; el Δ^8 -THC, que es semejante al compuesto anterior tanto en la afinidad como en la eficiencia con la que se une a los receptores cannabinoides; y el 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptil (HU-210), que tiene una mayor afinidad y eficiencia por los receptores que el Δ^9 -THC.
- Cannabinoides no clásicos, entre los cuales destaca el CP55940; aminoalquilindoles como el WIN55212-2 y endocannabinoides, entre los que se encuentran la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG).

2.1.- AGONISTAS SELECTIVOS DE RECEPTORES CB₁

Se han desarrollado compuestos más selectivos modificando la estructura de agonistas endógenos como la AEA. Entre este tipo de compuestos se encuentran la R-metanandamida, la araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA), la araquidonilciclopropilamida (ACPA) y el O-1812 (Howlett y cols., 2002; Pertwee, 1999, 2005b). Además, estos compuestos son más resistentes a la hidrólisis enzimática que la AEA (Di Marzo y cols., 2001; Howlett y cols., 2002; Pertwee, 2005b).

2.2.- AGONISTAS SELECTIVOS DE RECEPTORES CB₂

Los agonistas más utilizados como herramienta para la investigación sobre cannabinoides son el JWH133, cannabinoide clásico; y el JWH015, un aminoalquilindol (Howlett y cols., 2002; Pertwee, 2000, 2005b). Otros agonistas selectivos dentro de este grupo son el HU-308, el AM1241, los compuestos sintetizados por Merck L-759633 y L-759656, y el compuesto desarrollado por GlaxoSmithKline, GW405833.

3.- ANTAGONISTAS CANNABINOIDES

Existen dos tipos de antagonistas de receptores cannabinoides: antagonistas selectivos de receptores CB₁ como el SR144716A (Rimonabant) (Rinaldi-Carmona y cols., 1994; Howlett y cols., 2002; Pertwee, 1999, 2005b) y los análogos estructurales del mismo, como el AM251 y AM281; y antagonistas selectivos de receptores CB₂, entre los cuales se encuentran el SR144528 (Rinaldi-Carmona y cols., 1998) y el AM630 (Ross y cols., 1999a). Dichos compuestos se clasifican como agonistas inversos, ya que en algunos sistemas son capaces de producir efectos a través de receptores cannabinoides contrarios a los producidos por los agonistas de los receptores (Pertwee, 2005). Algunos de estos compuestos se utilizan en la actualidad en la clínica, entre ellos el

SR141716A (Rimonabant, Acomplia, Sanofi-Aventis) que se prescribe para el tratamiento de la obesidad.

RECEPTORES DE CANNABINOIDES

1.- ASPECTOS GENERALES

En 1990, Herkenham y colaboradores caracterizaron mediante el uso del CP55940 la distribución del receptor de cannabinoides en secciones de cerebro de varios mamíferos, entre ellos el hombre (Herkenham y cols., 1990). La distribución a nivel del SNC, aunque no era similar a la de otras drogas y receptores de neurotransmisores conocidos, coincidía con la de algunos segundos mensajeros. Basándose en los trabajos de Worley y colaboradores (1986), observaron que las áreas del cerebro con una elevada densidad de receptores de cannabinoides coincidían con áreas en las que abundan los sistemas de segundos mensajeros acoplados a proteínas G. Esta correspondencia anatómica entre ambos sistemas y la ausencia de marcaje tras el uso de nucleótidos de guanina llevó a concluir que los receptores de cannabinoides están acoplados a proteínas G, tal y como previamente habían descrito Devane y cols. (1986) mediante estudios *in vitro*.

Así, los receptores de cannabinoides están formados por un dominio amino-terminal extracelular, otro carboxi-terminal intracelular, y siete dominios transmembrana.



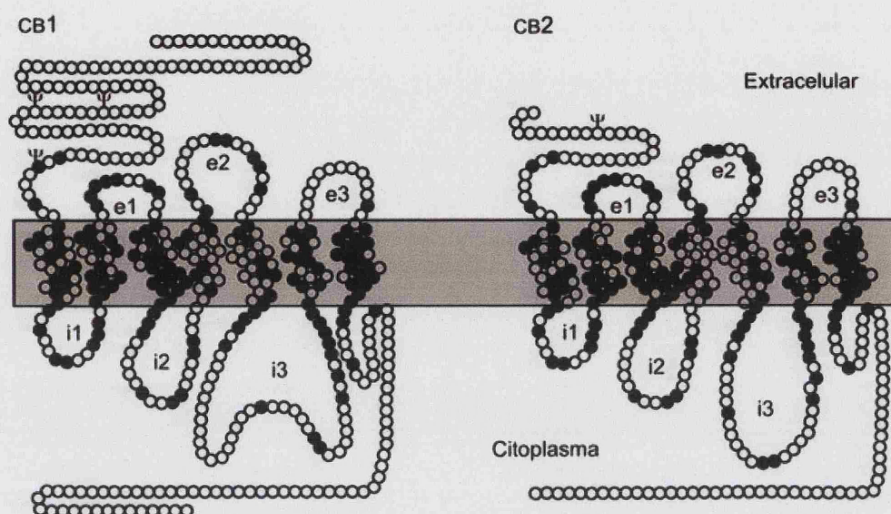


Figura 1.- Estructura de los receptores cannabinoides (tomado de Rodríguez y cols., 2005)

En los estudios realizados con tejidos de mamíferos se observó que éstos expresan dos receptores de cannabinoides: el receptor CB₁, clonado en el laboratorio de Tom Bonner en 1990, y el receptor CB₂, clonado por Sean Munro en 1993. Los receptores CB₁ se encuentran predominantemente en terminales nerviosos centrales y periféricos, donde inhiben la liberación de neurotransmisores. Además, se expresan en células y tejidos no neurales, como la glándula pituitaria, las células del sistema inmune y tejidos del aparato reproductor. Por su parte, los receptores CB₂ se encuentran principalmente en células del sistema inmune e intervienen en procesos como la migración celular y la liberación de citoquinas.

2.- RECEPTORES CB₁

2.1.- DISTRIBUCIÓN

Como se ha mencionado antes, la distribución de los receptores de cannabinoides se conoció por primera vez mediante estudios autorradiográficos en secciones de cerebro de varias especies de mamíferos usando el radioligando [³H]CP55,940, que es capaz de unirse con gran afinidad a los receptores CB₁ (Herkenham y cols., 1990). Concretamente, en rata y ratón las autorradiografías

mostraron que la mayor densidad de receptores se encuentra en el globo pálido, la *substantia nigra pars reticulata* y las capas moleculares del cerebelo y el giro dentado del hipocampo. También se encontró un marcaje intenso en la corteza cerebral, otras regiones del hipocampo y el estriado; y un marcaje tenue en tálamo y tallo cerebral (Herkenham y cols., 1991). Estos estudios revelaron que la densidad de receptores de cannabinoides es mayor que la de otros receptores para neuropéptidos y similar a la de receptores corticales de benzodiazepinas, estriatales de dopamina y de glutamato.

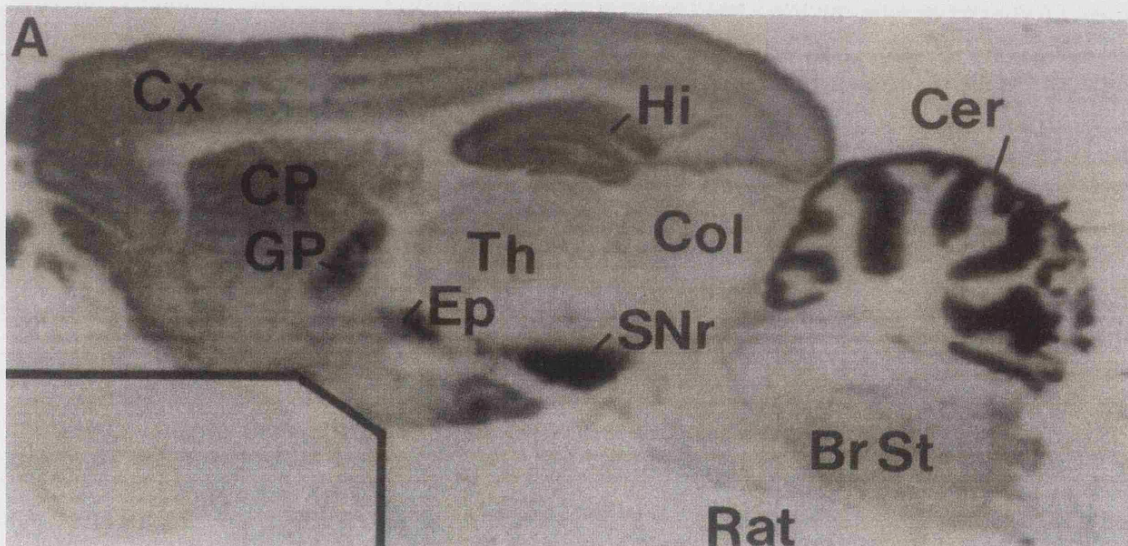


Figura 2.- Densidad de receptores CB₁ en corte sagital de cerebro de rata medida por autorradiografía con [³H]CP55,940 (Herkenham y cols., 1990).

Dos años más tarde, el grupo de Mailleux y Vanderhaeghen (1992) describió la distribución del mensajero de receptores CB₁ en rata mediante hibridación *in situ*. Los resultados de este estudio concordaron con los resultados obtenidos anteriormente mediante técnicas autorradiográficas, teniendo en cuenta que las técnicas de hibridación *in situ* miden los niveles de ARNm en las células y la autorradiografía de receptores mide los niveles de los productos proteicos correspondientes que pueden haberse translocado a lugares más lejanos (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992). Los mayores niveles de receptores se encontraron en las capas I y VI de la corteza, tanto en células piramidales como

interneuronas, giro dentado del hipocampo, *substantia nigra pars reticulata*, globo pálido, núcleo entopeduncular, región lateral del caudado-putamen y capa molecular del cerebelo. Se encontraron niveles bajos de receptores en tálamo, hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992).

En 1997, el grupo de Glass y cols. describió la distribución de los receptores CB₁ mediante técnicas de autorradiografía cuantitativa utilizando el compuesto [³H]CP55940 en el cerebro fetal humano (33 semanas de gestación), cerebro neonatal (3-6 meses) y cerebro adulto (21-81 años). Los resultados de este estudio muestran que la mayor densidad de este tipo de receptores se encuentra en el giro dentado del hipocampo, corteza entorrinal, amígdala, capas I y VI de la corteza, globo pálido, *substantia nigra pars reticulata* y capa molecular del cerebelo. Por el contrario, apenas existen receptores de este tipo en médula espinal. La distribución de receptores CB₁ en el cerebro adulto es muy similar a la del cerebro fetal y neonatal, a diferencia de que el marcaje en estos últimos es más intenso, sobre todo en la *substantia nigra* y los ganglios basales.

Posteriormente, el desarrollo de anticuerpos que se unían a los extremos N- y C-terminal de los receptores CB₁, permitieron realizar estudios inmunohistoquímicos para conocer la localización celular de este tipo de receptores en cerebro de rata. Dichos estudios tenían una mayor resolución que los autorradiográficos, aunque ambas aproximaciones mostraron resultados muy similares (Tsou y cols., 1998, 1999; Elphick and Egertová, 2001). El grupo de Egertová y Elphick (1998) observó, mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal del receptor, que éste se expresa en los axones y los terminales de las neuronas. Tsou y cols. (1998) describieron la distribución de los receptores CB₁ en el cerebro de rata mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal del receptor. Los resultados de este grupo confirmaron los resultados obtenidos previamente mediante métodos autorradiográficos o hibridación *in situ*. La mayor densidad de receptores CB₁ se encuentra en los axones, cuerpos celulares y dendritas de neuronas corticales como el bulbo olfatorio y la

formación hipocampal. También se encontró un marcaje muy intenso en las células en cesta que rodean las células de Purkinje en el cerebelo. Por el contrario, el marcaje era menor en áreas como el caudado-putamen y la amígdala (Tsou y cols., 1998).

En 1999, este mismo grupo demostró que las neuronas hipocampales que expresaban el receptor CB_1 eran neuronas GABAérgicas. Sin embargo, la localización subcelular de ambos marcadores era distinta: los receptores CB_1 se distribuyen de forma heterogénea dentro del citoplasma de la neurona, mientras que los receptores GABA se distribuyen de forma homogénea a lo largo del citoplasma (Tsou y cols., 1999).

2.2.- MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Los receptores de cannabinoides pertenecen a la familia de receptores acoplados a efectores a través de proteínas G.

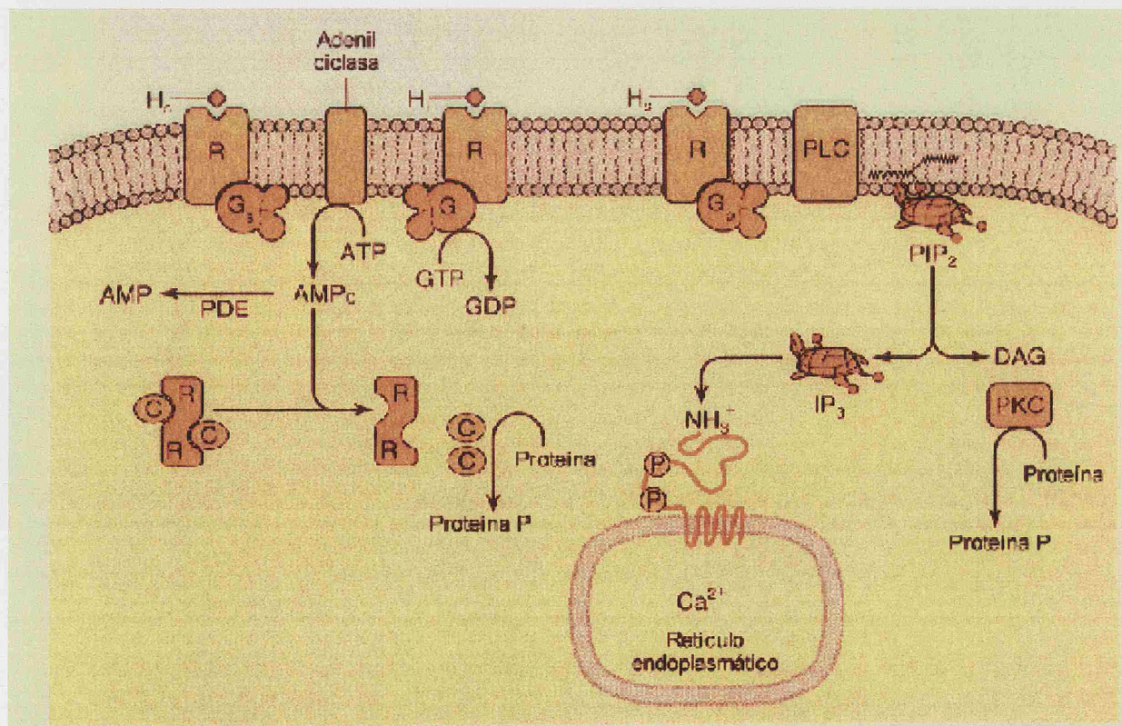


Figura 3.- Mecanismo de transducción de señales de receptores acoplados a proteínas G

En la mayoría de los tejidos, el receptor de cannabinoides se acopla a un efector a través de la proteína G inhibitoria Gi/o. El receptor de cannabinoides inhibe la adenilato ciclasa a través de la proteína Gi/o, disminuyendo las concentraciones de AMPc intracelulares. Otro de los efectores que puede estar regulando el receptor de cannabinoides a través de las proteínas G es la enzima fosfolipasa C, que hidroliza el fosfatidil inositol, un lípido de membrana, en diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP).

Además, se ha demostrado que los receptores de cannabinoides están acoplados de forma inhibitoria a canales de calcio de tipo N y P/Q, que son los más numerosos en la neurona presináptica. Esto posibilita la modulación de la liberación de neurotransmisores por parte de los cannabinoides. Recientemente, se ha demostrado que los cannabinoides pueden inhibir también los canales de calcio de tipo L en la musculatura lisa de arterias, lo que se correlaciona con el papel vasodilatador que pueden tener estos compuestos.

1. ACTIVACIÓN DE MAPK

En muchos tipos celulares se ha observado que los cannabinoides activan la cascada de la proteína MAPK a través de receptores CB₁. En esta cascada se activan tres enzimas: una ser/thr quinasa con actividad MAP quinasa quinasa llamada MEKK, una quinasa dual capaz de fosforilar tanto en ser/thr como en tyr denominada MEK y una ser/thr quinasa llamada MAPK. En mamíferos hay descritos al menos cuatro grupos de cascadas MAPK, que se activan en respuesta a distintos estímulos y tienen diferentes funciones biológicas. Dos de ellos se activan en respuesta a factores de crecimiento y hormonas, y están relacionados con la regulación del crecimiento y la diferenciación celular. Los otros dos son activados por estímulos de estrés y están relacionados con la regulación de muerte celular (apoptosis), transformación tumoral e inflamación. Los cannabinoides pueden activar los cuatro tipos de cascadas y, mediante este mecanismo, controlan la supervivencia o la muerte celular (Guzmán y cols., 2001).

2. PI3K/PKB

La vía de las quinasas fosfatidil inositol trifosfato quinasa/proteín quinasa B (PI3K/PKB) interviene en la regulación del crecimiento y del metabolismo celular. Se ha observado que el receptor de cannabinoides CB₁ puede activar esta cascada, participando en la regulación del metabolismo de la glucosa y del crecimiento celular (Gómez del Pulgar y cols., 2000).

3. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que se forma por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). A concentraciones bajas puede actuar como mensajero intercelular, mientras que a concentraciones elevadas tiene efectos perjudiciales a través de la generación de radicales libres. Hay dos tipos de óxido nítrico sintasas: la que se expresa de forma constitutiva en algunas células (cNOS) y la inducible (iNOS) que se produce en respuesta a estímulos generalmente de tipo inflamatorio. Se ha observado que los cannabinoides aumentan la producción de NO a través de la activación de cNOS (Fimiani y cols., 1999; Stefano y cols., 2000). Esto podría explicar algunos efectos de los cannabinoides como la vasodilatación, la disminución de la función inmunovascular y la inhibición de la liberación de neurotransmisores. En algunos casos se ha comprobado que los cannabinoides pueden atenuar la inducción de iNOS provocada por estímulos inflamatorios, pudiendo atribuir un efecto anti-inflamatorio a este tipo de compuestos (Stefano y cols., 2000).

4. FOSFOLIPASA D Y FOSFOLIPASA A₂

Otra de las posibles vías de actuación de los cannabinoides a través del receptor CB₁ es la formación de ácido araquidónico (AA), un ácido graso poli-insaturado que se forma por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) o la fosfolipasa D (PLD). Ambas enzimas son activadas por los cannabinoides en algunos tipos celulares (Burstein y cols., 1994). El ácido araquidónico puede metabolizarse

dando lugar a prostaglandinas, tromboxanos e hidroperoxiácidos. Además, la fosfolipasa A₂ también puede activarse a través de la cascada de las MAPKs, por un aumento de la concentración de calcio intracelular o por la activación de la proteína quinasa C (PKC).

2.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

La mayoría de las cascadas de transducción intracelulares desembocan en la producción de proteínas denominadas factores de transcripción que se translocan al núcleo, donde regulan la expresión de genes. Hay dos tipos de factores de transcripción: los constitutivos, que se encuentran unidos al ADN en ausencia de estímulo; y los inducibles, que se activan tras un estímulo. Uno de los factores de transcripción constitutivos modulado por los cannabinoides es la familia de factores del elemento de respuesta de unión a AMPc/factor autotumoralítico (CREB/ATF) (Herring y cols., 2001). En concreto se ha observado que los cannabinoides pueden activar el factor de transcripción temprano Krox-24 (Bouaboula y cols., 1995) y modular los factores Fos/Jun y el factor nuclear kappa B (NFκB).

2.3.- FUNCIONES

Lo dicho hasta ahora contribuye a la comprensión de los efectos de los compuestos cannabimiméticos y la función de los cannabinoides endógenos o endocannabinoides.

La localización de los receptores CB₁ a nivel presináptico posibilita que los cannabinoides puedan modular la liberación de neurotransmisores en los terminales nerviosos. Esta capacidad de los endocannabinoides se ha demostrado en numerosos experimentos. Los primeros datos aportados fueron los relacionados con el THC y la inhibición de la liberación de acetilcolina en el íleo de ratón (Gill y cols., 1970; Roth, 1978). Posteriormente, se comprobó que el THC inhibe la liberación de glutamato, GABA, noradrenalina, dopamina,

serotonina (5-HT) y acetilcolina (Schlicker and Kathmann, 2001). En todos los casos, este efecto inhibitorio sobre la liberación de neurotransmisores es revertido por el rimonabant, antagonista selectivo de receptores CB₁.

2.3.1.- CONTROL DEL DOLOR

Los receptores CB₁ juegan un papel importante en la percepción del dolor, ya que se encuentran en la médula espinal y terminales centrales y periféricos de neuronas primarias aferentes que median los procesos de dolor neuropático. En animales en los que se ha delecionado el receptor (CB₁^{-/-}) se ha observado una menor anti-nocicepción (Valverde y cols., 2000). Los agonistas de receptores CB₁ tienen actividad anti-nociceptiva en un gran número de modelos experimentales de dolor, y dicha actividad es antagonizada por el compuesto SR141716A (Fuentes y cols., 1999; Fox y cols., 2001; Pertwee, 2001).

2.3.2.- CONTROL PSICOMOTOR

El número de receptores CB₁ es elevado en los ganglios basales y cerebelo, regiones responsables de la función psicomotora. Los cannabinoides, por tanto, podrían jugar un papel importante en el control motor. En roedores se ha observado un efecto trifásico de los cannabinoides, de forma que dosis bajas de THC (0.2 mg/kg) disminuyen la actividad locomotora, dosis intermedias (1-2mg/kg) estimulan el movimiento y dosis elevadas (2.5mg/kg) producen catalepsia (Sañudo-Peña y cols. , 2000).

El efecto de los cannabinoides sobre el control motor se debe, en parte, a su acción sobre receptores localizados en cerebelo o en los ganglios basales (Patel y Hillard, 2001). Los efectos motores provocados por estos compuestos son el resultado de la capacidad de interferir en la actividad de los tres principales neurotransmisores implicados en la funcionalidad de los ganglios basales, es decir, dopamina, GABA y glutamato. En el circuito de los ganglios basales la dopamina aparece como neurotransmisor en las neuronas que van desde la

substantia nigra al cuerpo estriado y cuya disfunción origina la enfermedad de Parkinson (Blandini y cols., 2000). El GABA se localiza en neuronas estriatales que proyectan hacia la *substantia nigra* y el núcleo entopeduncular (vía directa), o hacia el globo pálido (vía indirecta), y cuya disfunción origina la enfermedad de Huntington u otras patologías con alteraciones coreicas (Reddy y cols., 1999). Por último, el glutamato es el neurotransmisor utilizado por las aferencias que, desde la corteza alcanzan el cuerpo estriado, así como por las neuronas subtalámiconigrales que aparecen hiperactivas en la enfermedad de Parkinson e hipofuncionales en el corea de Huntington (Blandini y cols., 1996).

Además, para entender mejor el efecto de los cannabinoides sobre el control motor, es necesario tener en cuenta la interacción del sistema cannabinoide con otros sistemas de señalización. Giuffrida y cols. (1999) demostraron que los agonistas de los receptores de dopamina D₂ producen un aumento de los niveles de anandamida en el estriado. También se ha descrito que las células granulares del cerebelo expresan, además de receptores CB₁, receptores opioides de tipo μ , de adenosina tipo A₁ y GABA-B, todos ellos receptores acoplados a proteínas G capaces de inhibir la liberación de glutamato.

2.3.3. - MEMORIA

La intoxicación aguda por cannabis produce alteraciones de la memoria a corto plazo. En animales, también se ha observado una menor capacidad para realizar tareas de aprendizaje espacial tras la administración de THC, cannabinoides sintéticos y anandamida. Este efecto es revertido por el rimonabant, lo cual indica que se trata de un efecto mediado por receptores CB₁. Las alteraciones mencionadas se deben a la presencia de los receptores cannabinoides en el hipocampo, más concretamente en neuronas GABAérgicas del giro dentado, neuronas piramidales glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas; inhibiendo en todas ellas la liberación de ambos neurotransmisores. Algunos autores proponen que este efecto de los

cannabinoides sobre la memoria es similar al que se observa tras la retirada quirúrgica del hipocampo (Hampson and Deadwyler, 1999).

2.3.4.- PERCEPCIÓN

Los efectos de los compuestos cannabinoides sobre la percepción se deben a la presencia de receptores CB₁ en neuronas corticales GABAérgicas (Marsicano and Lutz, 1999), que se concentran en las capas II, III, V y VI de la corteza.

Los estudios que se han realizado para conocer el efecto de los cannabinoides sobre la percepción han revelado resultados confusos y contradictorios. Los consumidores de cannabis describen un aumento subjetivo de las percepciones auditivas y visuales, mientras que los estudios realizados en laboratorio no muestran cambios en dichas percepciones. El único efecto subjetivo del cannabis que se ha demostrado es la percepción, por parte de los consumidores, de una excesiva rapidez en el paso del tiempo. El mismo efecto también se ha observado en ratas entrenadas para responder a una recompensa con comida en intervalos de tiempo prefijados, de forma que los animales tratados con THC o WIN55,2122 tienen tiempos más cortos, efecto que es revertido por el rimonabant (Han and Robinson, 2001).

2.3.5.- ENFERMEDADES MENTALES

Giuffida y cols. (2004) han encontrado mayores niveles de anandamida en el líquido cerebroespinal de pacientes con esquizofrenia con respecto a pacientes sanos. Además, existen datos que muestran que el uso de cannabis puede desencadenar episodios psicóticos en individuos vulnerables a través de la desensibilización de receptores CB₁.

El sistema cannabinoide también se ha propuesto como posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades en las que se produce una

respuesta inadecuada a los estímulos aversivos, como por ejemplo, el estrés post-traumático o las fobias (Marsicano y cols., 2002).

2.3.6.- EXCITOTOXICIDAD

Se ha demostrado el papel protector de los cannabinoides endógenos y exógenos en los procesos excitotóxicos (Marsicano y cols., 2003). La inyección de ácido kaínico eleva los niveles de anandamida en el hipocampo, e induce mayor número de convulsiones en animales que carecen de receptores CB₁ o en los que se ha bloqueado el receptor. En los animales que carecen del receptor no se producen convulsiones tras la inyección del ácido si previamente se les administra el compuesto UCM707, inhibidor de la recaptación de anandamida.

El bloqueo de la activación de los receptores CB₁ aumenta la susceptibilidad frente a la excitotoxicidad (Khaspekoy y cols., 2004; Karanian y cols., 2005). Los ratones que carecen de este receptor son más sensibles al daño isquémico (Parmentier-Batteur y cols., 2002). Estos datos indican que los receptores CB₁ son importantes para la supervivencia de las neuronas.

2.3.7.- ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica del SNC que causa lesiones de tipo inflamatorio que provocan una desmielinización, produciéndose una inhibición de la neurotransmisión (Campston y Coles, 2002). La destrucción de la mielina hace que se produzca una expresión aberrante y una redistribución de los canales iónicos del axón. Esto hace que los axones sean más sensibles a los efectos dañinos de los radicales libres y la excitotoxicidad por glutamato, desencadenando una neurodegeneración crónica (Foster y cols., 1980; Block y cols., 2000; Pitt y cols., 2000; Smith y cols., 2000; Werner y cols., 2001; Kapoor y cols., 2003).

Se ha demostrado en diferentes modelos animales que los cannabinoides mejoran la sintomatología y la patología de la esclerosis múltiple (Arévalo-Martín y cols., 2003), siendo estos efectos mayoritariamente mediados por los receptores CB₁ presentes en las neuronas, aunque también podrían estar implicados los receptores CB₂ presentes en la glia (Lyman y cols., 1989; Wirguin y cols., 1994; Arévalo-Martín y cols., 2003). También se han desarrollado ensayos clínicos en humanos, en los que la administración de cannabinoides reduce la espasticidad y los temblores (Robson y cols., 2002).

2.3.8.- REGULACIÓN DEL APETITO

Muchos consumidores de cannabis afirman que tienen mayor apetito, en particular por los alimentos dulces. Este efecto de los cannabinoides se ha demostrado en condiciones experimentales (Hollister, 1971; Mattes y cols., 1994). Sin embargo, los estudios realizados en humanos han arrojado resultados muy variables.

En los ensayos clínicos en los que se ha administrado THC (dronabinol) se ha observado que este compuesto disminuye la falta de apetito y la pérdida de peso en pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) (Beal y cols., 1995). En EEUU se ha aprobado el uso de dicho compuesto para este tipo de pacientes.

Numerosos autores han demostrado que los endocannabinoides son capaces de modular los efectos supresores del apetito atribuidos a la leptina (Di Marzo y cols., 2001a).

2.3.9.- EFECTO ANTIEMÉTICO

La aplicación clínica de los cannabinoides mejor documentada es su capacidad de disminuir las náuseas y vómitos en pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia. En EEUU se ha aprobado el uso del THC

(dronabinol) y la nabilona, aunque todavía no han resultado ser de gran utilidad, debido al estrecho margen que existe entre la dosis con efecto anti-emético y la dosis que produce los efectos no deseados. Por otra parte, los estudios en animales demuestran que los efectos anti-eméticos de los cannabinoides son mediados por receptores CB₁ (Darmani, 2002).

2.3.10.- CÁNCER

Algunos tipos de células cancerígenas producen anandamida y 2-AG, que actúan sobre los receptores de cannabinoides inhibiendo su proliferación. Este efecto inhibitorio puede potenciarse con el uso de inhibidores del metabolismo de endocannabinoides. La activación de receptores CB₁ produce una disminución de la proliferación de células cancerígenas, la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (Bifulco y cols., 2001; Guzmán y cols., 2005).

2.3.11.- APARATO DIGESTIVO

Se han encontrado niveles elevados de endocannabinoides en algunas enfermedades en las que existe inflamación del tracto digestivo o diarrea. También se han encontrado receptores CB₁ en neuronas del plexo mientérico. Esta hiperactividad del sistema cannabinoide mejora alguno de los síntomas característicos de este tipo de enfermedades, y esta mejora puede potenciarse con el uso de agonistas cannabinoides o inhibidores del metabolismo de endocannabinoides (Izzo y cols., 2005).

Izzo y cols. (2003) han encontrado una elevada densidad de receptores CB₁ en el tracto intestinal. Estos receptores al activarse disminuyen la acumulación de fluido intestinal inducida por la toxina colérica en ratones. Massa y cols. (2004) han demostrado que la colitis inducida por el compuesto DNBS es más acusada en ratones que carecen del receptor CB₁ que en ratones *wild-type*.

3.- RECEPTORES CB₂

3.1.- DISTRIBUCIÓN

Los receptores CB₂ se expresan, bajo condiciones no patológicas, en células del sistema inmune: macrófagos, células B y NK (*natural killer*), monocitos, neutrófilos y células T. Además, se ha descrito su presencia en tejidos asociados al sistema inmune como el bazo y el timo (Klein y cols., 2003). Dado que los tipos celulares mencionados intervienen en procesos inflamatorios, se considera que los receptores CB₂ pueden desempeñar importantes funciones en estos procesos. Su presencia en estas células podría explicar los efectos moduladores que ejercen los cannabinoides sobre la respuesta inmune (Kaminski, 1998).

Numerosos grupos demostraban la ausencia de este tipo de receptores en cerebro, pero existen estudios recientes que demuestran la presencia de los mismos en neuronas situadas en estructuras cerebrales localizadas como el tallo cerebral (Van Sickle y cols., 2007). Este grupo ha observado la expresión del ARNm de receptores CB₂ en cerebelo, tallo cerebral y corteza mediante RT-PCR; y la expresión del receptor en neuronas del núcleo motor dorsal del vago, el núcleo ambigüo, y el núcleo trigémino mediante técnicas inmunohistoquímicas. Por el contrario, estos autores no observaron su expresión en células gliales y vasos sanguíneos. Además, se ha descrito la expresión de receptores CB₂ en células granulares del cerebelo (Skaper y cols., 1996) y células endoteliales en cultivo (Golech y cols., 2004).

A diferencia de los receptores CB₁, cuya expresión es muy amplia y constitutiva en el organismo, la de los receptores CB₂ es inducible tras diversos estímulos. Carlisle (2002) utilizó células de microglía en distintos estados de activación y demostró que los receptores CB₁ se expresan de forma constitutiva en todos los estados de activación, mientras que la expresión de los receptores CB₂ se reduce a células en estado activado.

3.2.- MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Al igual que los receptores CB₁, los receptores CB₂ también pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, y regulan la actividad de varias vías de señalización, incluyendo enzimas que producen segundos mensajeros cíclicos y distintas quinasas. Los receptores CB₂ estimulan la vía de las MAPKs, entre ellas la cascada de la quinasa ERK (Bouaboula y cols., 1996; Carrier y cols., 2004; Palazuelos y cols., 2006), la vía de la MAPK p38 (Gertsch y cols., 2004) y la cascada de la PI3K-Akt (Molina-Holgado y cols., 2002; Samson y cols., 2003; Palazuelos y cols., 2006). Sin embargo, los receptores CB₂ difieren de los CB₁ en que no son capaces de modular los canales de calcio tipo-Q.

3.3.- FUNCIONES

El desarrollo de animales que carecen del receptor CB₂ ha permitido discriminar las funciones de los compuestos cannabinoides mediadas por ambos tipos de receptores. En estos animales desaparecen los efectos inmunomoduladores de los compuestos cannabinoides y se mantienen los efectos comportamentales mediados por receptores CB₁ (Buckley y cols., 2000).

3.3.1.- CONTROL DEL DOLOR

La activación de los receptores CB₂ produce analgesia. La administración sistémica de agonistas selectivos de este receptor como el HU308, GW405833 y AM1241 produce anti-nocicepción en varios modelos de dolor en rata (Hanus y cols., 1999; Valenzano y cols., 2005). Este efecto es revertido por la administración de antagonistas selectivos CB₂. La capacidad analgésica de los receptores CB₂ podría deberse a la presencia de este tipo de receptores en células no neuronales de la piel que, al activarse, producen la liberación de moléculas que, a su vez, activan nociceptores periféricos (Malan y cols., 2001). En un

modelo de dolor inducido por temperatura en rata se ha observado que el AM1241 produce anti-nocicepción a través de la activación de receptores CB₂ presentes en queratinocitos, que producen β -endorfina, la cual activa receptores opioides localizados en terminales de neuronas primarias aferentes. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que las neuronas sensoriales expresen receptores CB₂ capaces de mediar la analgesia (Ross y cols., 2001). Por último, los agonistas cannabinoides también son capaces de aliviar el dolor en humanos, como ocurre en pacientes con dolor neuropático, cáncer y esclerosis múltiple (Notcutt y cols., 2004).

Por otro lado, algunos autores han descrito un aumento de los niveles del ARNm de los receptores CB₂ en la médula espinal de un modelo de dolor neuropático en rata (Beltramo y cols., 2006). Estos resultados sugieren que los agonistas CB₂ también pueden mediar sus efectos analgésicos actuando a través de receptores situados a nivel neuronal, siendo este tipo de receptores una diana terapéutica para el tratamiento del dolor crónico.

3.3.2.- ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los receptores CB₂ participan en los procesos inmunes, favoreciendo la proliferación celular, inhibiendo la producción de citoquinas y promoviendo la apoptosis (Klein y cols., 2003). Además, los cannabinoides mejoran los síntomas asociados a enfermedades como la esclerosis múltiple tanto en humanos como en roedores en modelos de encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Lyman y cols., 1989; Wirguin y cols., 1994; Arévalo-Martín y cols., 2003).

3.3.3.- EFFECTO ANTIEMÉTICO

La presencia de los receptores CB₂ en el tallo cerebral ha llevado a diversos grupos a investigar su posible efecto en el control de la emesis. Es sabido que el Δ^9 -THC actúa a nivel de las neuronas del complejo dorsal del vago, lugar en el cual se integran los reflejos eméticos. Este complejo incluye el

núcleo del tracto solitario, el área postrema y el núcleo motor dorsal del vago, lugares en los que se ha encontrado expresión de receptores CB₂ (Van Sickle y cols., 2005). Este grupo observó que tanto la AEA como el 2-AG son capaces de disminuir la emesis de forma dosis-dependiente en hurones tratados con morfina 6-glucurónido, un potente estímulo emético. El efecto antiemético de la AEA es revertido por el antagonista selectivo de receptores CB₁ AM251, corroborando que la AEA no es muy eficaz actuando sobre receptores CB₂. Por el contrario, los efectos antieméticos producidos por el 2-AG son revertidos por el antagonista selectivo de receptores CB₁, AM251, y selectivo de receptores CB₂, AM630. Estos resultados demuestran que los compuestos cannabinoides son capaces de reducir la emesis actuando a través de los receptores CB₂ presentes en el tallo cerebral, y que el efecto es mayor si se utiliza un cannabinoide capaz de activar ambos tipos de receptores.

3.3.4.- CÁNCER

La expresión de receptores CB₂ aumenta con la malignización de los tumores gliales y de mama, inhibiendo la diferenciación de neutrófilos (Sánchez y cols., 2001; Alberich y cols., 2004; Caffarel y cols., 2006).

Los últimos estudios realizados con cannabinoides demuestran que la administración de estos compuestos en gliomas tiene un efecto antitumoral (Guzmán y cols., 2003; Velasco y cols., 2004). Dicho efecto también se ha observado tras la administración de agonistas para ambos tipos de receptores en células C6, varias líneas celulares de astrocitoma y células obtenidas a partir de biopsias de astrocitoma humano (Sánchez y cols., 2001).

La actividad antitumoral de los compuestos cannabinoides se debe a la inducción de apoptosis en las células transformadas y la inhibición de los procesos de angiogénesis (Guzmán y cols., 2003). Los receptores CB₂ inducen la síntesis de ceramidas *de novo*, esfingolípidos que actúan como segundos mensajeros que inducen apoptosis. Los niveles celulares de ceramida están

inversamente relacionados con la progresión maligna de los tumores y el mal pronóstico de los astrocitomas humanos, de forma que los astrocitomas menos malignos tienen un mayor contenido de ceramidas que los más malignos (Velasco y cols., 2004). Los tumores necesitan la angiogénesis para poder llevar a cabo los procesos de nutrición, intercambio de gases y la eliminación de residuos. La inhibición de la angiogénesis constituye una buena herramienta para los tratamientos antitumorales. Blázquez y cols. (2003) demostraron que la administración de compuestos cannabinoides inhibe la angiogenesis y proponen que este efecto está mediado por la activación de receptores CB₂, que a su vez inhiben la vía de señalización del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

3.3.5.- ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La anandamida y el 2-AG producen hipotensión en enfermedades como el shock séptico y cardiogénico, y en hemorragias. También es posible que el sistema endocannabinoide sea capaz de proteger frente a la aterosclerosis. Los receptores CB₂ se expresan en los macrófagos y los linfocitos T que rodean las placas ateroscleróticas en arterias de humano y ratón (Steffens y cols., 2005). Además, la administración oral diaria de Δ^9 -THC inhibe la formación de estas placas en ratón, mediante la activación de receptores CB₂ (Steffens y cols., 2005).

4.- OTROS RECEPTORES CANNABINOIDES

Los estudios realizados con animales que carecen del receptor CB₁ o CB₂ han permitido identificar posibles receptores de cannabinoides adicionales.

4.1.- RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN NEURONAS

Existen varios datos que apoyan la existencia de receptores de cannabinoides distintos de los receptores CB₁ y CB₂. Se ha observado que la AEA y el WIN55,212-2 estimulan la unión de GTP γ S en membranas

preparadas a partir de cerebro de ratones *knockout* para el receptor CB₁, efecto que es débilmente antagonizado por el antagonista SR141716A. Sin embargo, la distribución de este receptor no coincide con la de los receptores CB₁ y CB₂ (Breivogel y cols. 2000, 2001). Por otro lado, Hájos y cols. (2001, 2002) estudiaron la transmisión glutamatérgica en la región CA1 del hipocampo en ratones, y observaron que el WIN55,212-2 y el CP55,940 inhiben la transmisión excitatoria con la misma eficacia en ratones *wild-type* y ratones *knockout* CB₁, y que este efecto es revertido por el antagonista SR141716 y la capsacepina. El WIN55,212-2 y el CP55,940 no interaccionan con los receptores de vanilloides tipo 1 (TRPV1), por lo que esta respuesta no está mediada por este tipo de receptores, sino por otro tipo de receptor cannabinoide. Por último, Welch y cols. (1998) estudiaron el efecto analgésico del THC a nivel de la médula espinal y encontraron que la potencia del antagonista SR141716A para inhibir los efectos producidos por el THC, la AEA y el CP55,940 es distinta a la que cabría esperar si se tratase de un efecto mediado por receptores CB₁.

4.2.- RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN VASOS SANGUÍNEOS

Algunos cannabinoides producen vasodilatación e hipotensión sin la activación de receptores CB₁, CB₂ y TPRV1 (Járai y cols., 1999; Begg y cols., 2005; Kunos y cols., 2002). Este tipo de respuesta es sensible a la toxina pertusis, lo cual indica que este tipo de receptor también está acoplado a proteínas G. Por ejemplo, el “abnormal cannabidiol” (abn-CBD), análogo del cannabidiol, actúa como un agonista sobre los receptores de cannabinoides aún por identificar, y no tiene efecto sobre los receptores CB₁ y CB₂. Existen varias líneas de investigación que demuestran que las células endoteliales expresan este receptor de cannabinoides, cuya activación estimula la producción de óxido nítrico (NO) y produce vasodilatación (Offertáler y cols., 2003).

4.3.- RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN CÉLULAS INMUNES

Se han llevado a cabo experimentos con la palmitoiletanolamida (PEA), análogo de la AEA, que apuntan la existencia de un receptor de cannabinoides adicional en las células inmunes. Piomelli y cols. (1998) demostraron que este compuesto disminuye el dolor asociado a varias respuestas de tipo inflamatorio, y que este efecto analgésico está mediado por otro receptor de cannabinoides.

Cabral y Marciano-Cabral (2005) demostraron que el levonantradol, agonista de receptores cannabinoides, inhibe la expresión del ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias interleuquina 1 ($IL-1\beta$) y el factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$); y que este efecto no es revertido por el antagonista del receptor CB_1 , SR141716A, o el del receptor CB_2 , SR144528. Estos datos apuntan la existencia de un receptor de cannabinoides distinto de los receptores CB_1 y CB_2 capaz de modular la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

Recientemente, se ha descrito que las células de microglía de la línea BV-2 producen e hidrolizan la PEA (Stella y Muccioli, 2007). Además, estos autores han observado que el compuesto URB602 es capaz de inhibir la hidrólisis de PEA en estas células mientras que el URB597 no tiene ningún efecto. Estos resultados sugieren que la PEA es degradada por un enzima presente en las células de microglía y aún por caracterizar, y que ésta podría ser una diana terapéutica en los procesos de neuroinflamación.

4.4.- RECEPTOR GPR55

El receptor GPR55 fue identificado en cerebro como un receptor huérfano acoplado a proteínas G (Sawzdargo y cols., 1999). El gen que codifica para este receptor está situado en el cromosoma 2 en ratón y en el cromosoma 6 en humanos. Mediante técnicas de *Northern blot* en tejidos humanos se observaron niveles elevados del ARNm de este receptor en el caudado-putamen.

Posteriormente, mediante técnicas de hibridación *in situ* se identificó en el hipocampo, tálamo y cerebro medio de rata (Sawzdargo y cols., 1999). La distribución de este receptor coincide con regiones del cerebro en las que los cannabinoides tienen efectos importantes, por lo que cabría esperar que algunos de esos efectos estén mediados a través de este receptor.

ENDOCANNABINOIDES

Hoy en día sabemos que los endocannabinoides actúan como mediadores endógenos, y conocemos los mecanismos de su biosíntesis e inactivación. Estos compuestos no son almacenados en reservorios en las células, sino que se producen en respuesta a diversos estímulos fisiológicos o patológicos, como por ejemplo la despolarización de la membrana neuronal o por los lipopolisacáridos presentes en la pared bacteriana, conclusión a la que se llegó a partir de diversos experimentos llevados a cabo con la anandamida (Di Marzo y cols., 1994). Después de ser sintetizados, la anandamida y el 2-AG se liberan al medio extracelular por un mecanismo aún desconocido, y actúan sobre los receptores de cannabinoides. Finalmente, la inactivación de estos compuestos se lleva a cabo en dos pasos: la recaptación en las células a través de un posible recaptador de membrana, aún por caracterizar, y la inactivación enzimática.

1.- SÍNTESIS DE AEA

La síntesis de AEA fue descrita por primera vez por Di Marzo y colaboradores (1994), los cuales demostraron que las neuronas del cerebro de rata producen AEA tras la estimulación con ionomicina o con agentes despolarizantes como el kainato o altas concentraciones de potasio.

Posteriormente, se han descrito dos vías de síntesis distintas (Di Marzo, 1998; Schmid, 2000; Sugiura y cols., 2002, 2006b; Di Marzo y cols., 2004): la primera vía es la N-acilación directa de la etanolamina, y la segunda es la

formación de la N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (PE) por la acción de la fosfodiesterasa (Figura 4).

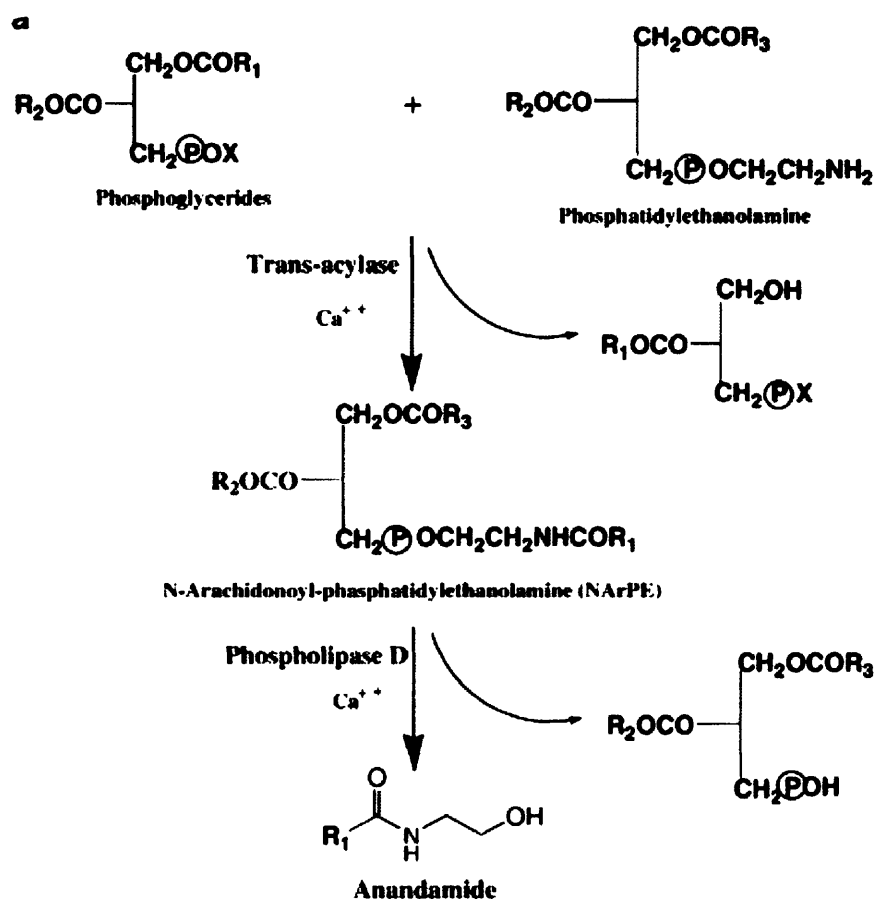


Figura 4.- Vía de síntesis de la AEA (Di Marzo y cols., 2004)

Recientemente, Liu y colaboradores (2006) han descubierto otra ruta de síntesis de AEA, en la que el N-araquidonoil PE es hidrolizado por la fosfolipasa C, produciendo N-araquidonoiletanolamina fosfato, que es posteriormente hidrolizado por una fosfatasa para dar AEA.

2.- SÍNTESIS DE 2-AG

Sugiura y colaboradores (1995) apuntaron que el 2-AG se puede formar a partir de fosfolípidos de membrana que contienen ácido araquidónico como el inositol, a través de enzimas como la fosfolipasa C y la diacilglicerol lipasa o la combinación de la fosfolipasa A₁ y la fosfolipasa C (Figura 5).

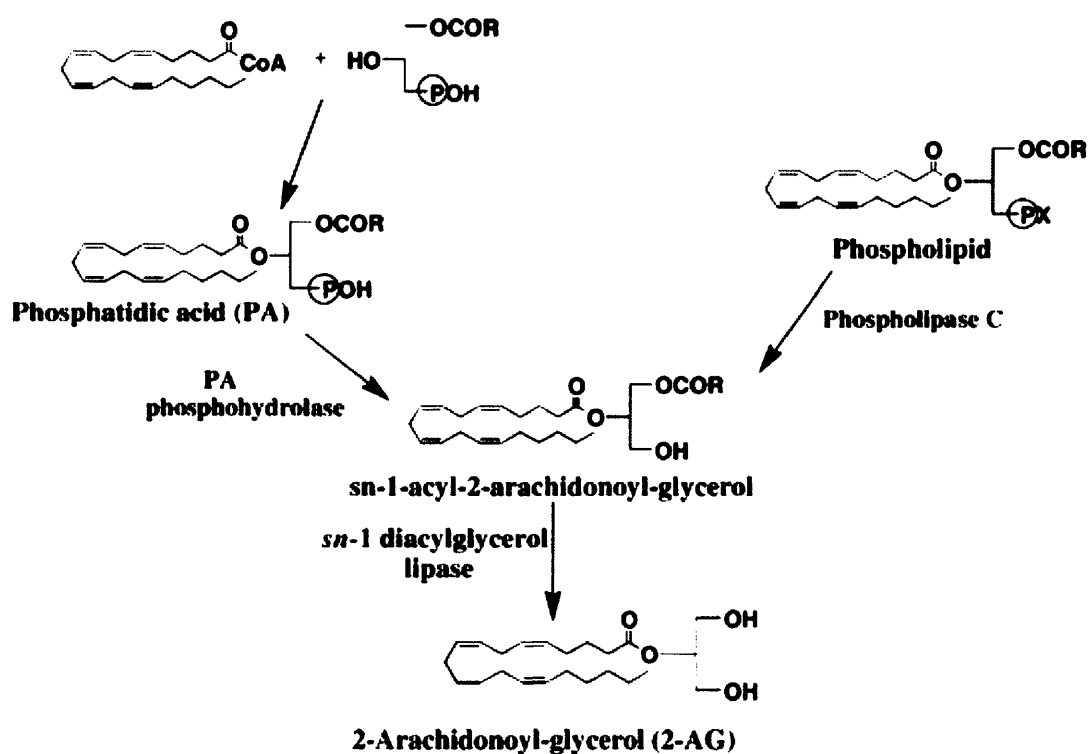


Figura 5.- Vía de síntesis del 2-AG (Di Marzo y cols., 2004)

SISTEMA DE INACTIVACIÓN DE ENDOCANNABINOIDES

1.- TRANSPORTADOR DE MEMBRANA

El primer paso para la inactivación de los endocannabinoides es su retirada rápida del medio extracelular. Los endocannabinoides tienen una naturaleza lipofílica, por lo que son capaces de difundir a través de la membrana plasmática si su concentración en el medio extracelular es superior a la del medio intracelular. Sin embargo, para que la retirada se produzca de una forma tan rápida como de hecho ocurre es necesario que se lleve a cabo mediante mecanismos más selectivos, como son los transportadores de membrana o los procesos enzimáticos capaces de reducir las concentraciones intracelulares de estos compuestos.

La anandamida y el 2-AG son recapturados en las células a través de mecanismos de transporte facilitado selectivos, saturables, dependientes de temperatura e independientes de Na^+ , conocidos como transportadores de membrana de la anandamida (TAMs) (Di Marzo y cols., 1994; Beltramo y cols., 1997; Bisogno y cols., 1997a; Hillard y cols., 1997; Maccarrone y cols., 1998, 2000a, b). Sin embargo, estas proteínas no han sido aún aisladas ni clonadas.

La existencia de un transportador de membrana de la anandamida es un tema muy controvertido. Existen autores como Glaser y cols. (2003) que proponen que la hidrólisis intracelular de la anandamida por la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) es suficiente para hacer que la anandamida difunda desde el medio extracelular hacia el interior de la célula.

2.- ENZIMAS DE DEGRADACIÓN

2.1.- AMIDO HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH)

Los endocannabinoides que se encuentran en el interior de la célula, son degradados por la FAAH, proteína integral de membrana que fue inicialmente clonada como la enzima que degrada el factor estimulador del sueño cis-9-octadecenoamida (oleamida) (Maurelli y cols., 1995). Este enzima hidroliza la AEA y el 2-AG a ácido araquidónico y etanol-amina o glicerol, respectivamente. La FAAH ha sido clonada en ratón, rata y humano, y muestra un alto grado de similitud y una especificidad similar por los sustratos en las tres especies (Cravatt y cols., 1996; Giang y cols., 1997).

Las propiedades cinéticas de la FAAH han sido revisadas en numerosos artículos y se han desarrollado inhibidores selectivos de la misma. También, se ha identificado la región promotora del gen que codifica para la enzima (Puffenbarger y cols., 2001; Waleh y cols., 2002), que es regulada a la alta por progesterona y leptina (Maccarrone y cols., 2003a, b) y a la baja por estrógenos y glucocorticoides (Waleh y cols., 2002).

En el SNC, los mayores niveles de actividad de FAAH se encuentran en el hipocampo y la corteza cerebral, mientras que existen niveles muy bajos en tallo cerebral e hipotálamo. En el cerebelo, bulbo olfatorio, estriado y tálamo se encuentran niveles intermedios del enzima (Thomas y cols., 1997; Egertová y cols., 1998a). Existe una buena correlación entre los niveles de actividad de FAAH y su distribución en las distintas áreas cerebrales mencionadas anteriormente, indicando que este enzima es la mayor responsable de la inactivación de las amidas de ácidos grasos en cerebro (Egertová y cols., 1998a). Además, el patrón de distribución de FAAH coincide mayoritariamente con el de los receptores CB₁ en cerebro de rata (Egertová y Elphick, 2000).

Se han desarrollado animales que carecen de esta enzima (FAAH^{-/-}), que se caracterizan por una mejor respuesta a la anandamida administrada de forma exógena (Cravatt y cols., 2001). El cerebro de estos ratones tiene unos niveles de anandamida 15 veces mayores al de los animales *wild-type*. Estos animales presentan también una menor sensibilidad a estímulos dolorosos, por lo que cabría pensar que los inhibidores de la enzima podrían usarse como analgésicos.

2.2.- OTRAS ENZIMAS DE DEGRADACIÓN

2.2.1.- MONOACILGLICEROL LIPASA (MAGL)

Existen datos que demuestran que los niveles de 2-AG no se encuentran aumentados en ratones que carecen de FAAH (Lichtman y cols., 2002). Este hecho podría explicarse con la existencia de otro tipo de enzimas encargadas de su hidrólisis: las monoacil glicerol lipasas (MAGLs), que se encuentran tanto en fracciones de membrana como citosólicas. Al igual que ha sido demostrado para la enzima FAAH (Egertová y cols., 1998), la MAGL de rata se encuentra en regiones del cerebro en las que existe un elevado número de receptores CB₁, como por ejemplo el hipocampo.

La MAGL participa en la regulación de los niveles de endocannabinoides en el SNC (Dinh y cols., 2002). Este enzima fue clonada recientemente en tejido adiposo de ratón (Karlsson y cols., 1997) y en cerebro de rata (Dinh y cols., 2002). La MAGL humana también se ha clonado y presenta un 84% de homología con la de ratón y un 85% con la de rata. La de rata presenta una distribución heterogénea en cerebro, con niveles elevados en regiones en las que abundan los receptores CB₁ como el hipocampo, la corteza y el cerebelo (Dinh y cols., 2002). Su localización a nivel celular corresponde a axones de neuronas piramidales y células granulares de la región CA3 del hipocampo (Gulyas y cols., 2004). La localización de este enzima en terminales presinápticos sugiere que puede participar en la terminación de la señal retrógrada en los mismos (Dinh y cols., 2002; Gulyas y cols., 2004).

Son escasos los estudios acerca de los efectos de los inhibidores de la MAGL en los diversos procesos mediados por los endocannabinoides debido a la falta de disponibilidad de agentes farmacológicos selectivos.

2.2.2.- CICLO-OXIGENASA 2 (COX-2)

La AEA y el 2-AG pueden sufrir reacciones de oxidación mediadas por la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2). Ambos endocannabinoides interaccionan con este enzima dando lugar a etanolamidas y ésteres de glicerol de las prostaglandinas, respectivamente (Kozak y cols., 2001, 2003). Este enzima se expresa de forma constitutiva en médula espinal (Ghilardi y cols., 2004) y sus niveles aumentan en respuesta a procesos inflamatorios (Svensson y Yaksh, 2002). Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos, que actúan inhibiendo la COX-2, son capaces de interaccionar con el sistema endocannabinoide tanto *in vitro* como *in vivo* (Fowler, 2007).

SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO Y PATOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

De lo dicho anteriormente, se concluye que el SCE desempeña importantes funciones neuromoduladoras en la fisiología del SNC. Además, hoy en día sabemos que el SCE se ve alterado en diversos procesos patológicos que afectan al SNC y que su modulación podría tener relevancia en la patogénesis de estos procesos y en su terapéutica (Fernández-Ruiz y cols., 2005).

1.- TRAUMA CEREBRAL CERRADO

El trauma cerebral desencadena una cascada de eventos que terminan en el desarrollo de edema, necrosis y alteración de diversas funciones cerebrales. Además, durante este proceso se acumulan mediadores dañinos en el cerebro,

entre los cuales se encuentran las citoquinas, como la interleuquina-1 (IL-1), la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Diversos grupos han demostrado que, tanto los agentes capaces de modular el TNF- α administrados de forma temprana como los agentes capaces de eliminar las ROS, pueden ser beneficiosos para el tratamiento en este tipo de situaciones y mejoran la recuperación neurológica de las víctimas.

El grupo de Shohami y cols. (1997) se valió de un modelo experimental de trauma cerebral cerrado (CHI) en rata, en el que se observan edema, alteraciones de la barrera hematoencefálica y alteraciones motoras y de la memoria. Además, se observó un aumento de la expresión del ARNm que codifica para la IL-1, IL-6 y el TNF- α . En este modelo, la administración de dexanabinol, HU-211, un cannabinoide sintético que carece de efectos psicoactivos y potente agente cerebroprotector, inhibe la producción de TNF- α y mejora los síntomas de este tipo de lesiones.

2.- HIPOXIA-ISQUEMIA

La isquemia cerebral focal (ICF) induce una muerte neuronal rápida en el núcleo isquémico que se va expandiendo gradualmente hacia la penumbra a consecuencia de la respuesta neuroinflamatoria. En las primeras fases, se produce una alteración de diversas funciones que terminan con un daño estructural permanente (Dirnagl y cols., 1999). Con el tiempo, se produce una activación de las células de microglía que dan lugar a procesos neuroinflamatorios que producen la muerte neuronal en la zona que rodea a la infartada, también denominada penumbra (Dirnagl y cols., 1999). Se ha propuesto que la inhibición de la activación microglial previene el daño neuronal en la zona de penumbra (Yrjänheikki y cols., 1999), lo cual indica que este tipo de células constituye una diana terapéutica para el tratamiento del daño inducido por hipoxia-isquemia.

Además de los procesos neurodegenerativos que tienen lugar durante los procesos de hipoxia-isquemia, también se activan procesos neuroprotectores en respuesta a los mismos, como por ejemplo la liberación de adenosina, que actúa inhibiendo la liberación de glutamato a nivel pre-sináptico (de Mendonca y cols., 2000; Pearson y cols., 2003).

Como se mencionó anteriormente, los receptores CB₁ están acoplados a proteínas G que inhiben los canales de calcio tipo-N dependientes de voltaje que están involucrados en la liberación de neurotransmisores (Mackie y Hille, 1992). Estos canales participan en la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato, que está implicado en la muerte neuronal que tiene lugar en patologías como el infarto, la hipoxia, hipoglucemia y epilepsia. En cultivos de células hipocámpales, se ha observado que los agonistas que actúan a nivel de receptores CB₁ inhiben la liberación de glutamato, reduciendo el daño neuronal mediado por este neurotransmisor (Shen y cols., 1996). El grupo de Nagayama y cols. (1999) demostró que el R(+)-WIN55212-2 protege el tejido cerebral de la región CA1 del hipocampo frente al daño isquémico, y que este efecto parece estar mediado por receptores CB₁, ya que se trata de un efecto estereoespecífico y que es revertido por el antagonista selectivo de este tipo de receptores, SR141716A.

Algunos autores han descrito un aumento de los niveles de endocannabinoides tras un episodio isquémico. Franklin y cols. (2003) describen un aumento de los niveles de PEA en la corteza cerebral de ratones con ICF. Además, este endocanabinoide junto con la AEA, activa la migración de las células de microglía, favoreciendo los procesos neuroinflamatorios. Este efecto de la PEA sobre las células microgliales no está mediado por receptores CB₁, CB₂, VR1 o abn-CBD, ya que no es revertido por los antagonistas selectivos de los receptores, ni por la capsazepina o el O-1918, respectivamente. Por el contrario, no se observó un aumento de los niveles de 2-AG en el cerebro de estos ratones.

Por otro lado, el grupo de Barger y cols. (2004, 2006) observó un aumento de los niveles de AEA en ratas tras una isquemia cerebral permanente, y que el tratamiento con el antagonista selectivo de receptores CB₁, SR141716A produce una disminución del área de infarto del 40% en comparación con los animales isquémicos control.

Otro modelo de hipoxia-isquemia *in vitro* es la privación de oxígeno y glucosa (OGD). Existen autores que demuestran que el antagonista selectivo de receptores CB₁, AM251, mejora la transmisión sináptica si se administra 30 ó 60 minutos después de la OGD (Youssef y cols., 2007). Este efecto no está mediado por la modulación de la transmisión de GABA, ya que la administración de bicuculina, un antagonista de receptores GABA, no previene los efectos del AM251.

La isquemia cardíaca tiene lugar cuando se detiene el flujo sanguíneo y no llegan a las células ni oxígeno ni glucosa. Esta isquemia se puede inducir en el laboratorio incubando las células cardíacas en un medio libre de oxígeno y glucosa. Shmist y cols. (2006) observaron que el pre-tratamiento con THC previene el daño isquémico, aunque este efecto está mediado por receptores CB₂, ya que es revertido por el antagonista selectivo de este tipo de receptores. Además, este grupo observó que el THC induce la expresión de la enzima iNOS en las células cardíacas, ya que el tratamiento de las mismas con el compuesto L-NAME, inhibidor del enzima, revierte el efecto protector del THC. Este grupo propone que el THC actuaría sobre los receptores CB₂ acoplados a proteínas Gi, disminuyendo los niveles de AMPc y aumentando los niveles de NO, que actúa como un inhibidor del metabolismo aeróbico. Por tanto, el THC reduce la utilización de glucosa y produce una disminución de los procesos metabólicos y de los requerimientos de oxígeno.

La hipoxia-isquemia neonatal es un proceso poco frecuente pero muy grave, ya que produce graves lesiones cerebrales que pueden producir la muerte o el desarrollo de importantes secuelas. En este proceso están implicados varios

factores como la excitotoxicidad por glutamato, el estrés oxidativo producido por la sobre-expresión de óxido nítrico, y factores inflamatorios como la IL-1 y el TNF- α (du Plessis y Volpe, 2002; Hamrick y Ferriero, 2003). Actualmente, existen numerosos trabajos que proponen a los endocannabinoides como sustancias con un efecto protector en los procesos de isquemia (Grundy y cols., 2001; Mechoulam y cols., 2002). Los cannabinoides pueden mediar este efecto protector a través de distintos mecanismos, entre los que se encuentran la inhibición de la liberación de glutamato, la inducción de hipotermia o por sus propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes (Grundy et al, 2001; Mechoulam et al, 2002; Howlett et al, 2004). En animales, se ha descrito que la administración exógena de anandamida (Van der Stelt et al, 2001b) o de Δ^9 -THC (Van der Stelt et al, 2001a) produce neuroprotección en un modelo de ratas recién nacidas con daño neuronal excitotóxico inducido por la inyección intracerebral de ouabaína. Posteriormente, el grupo de Martínez-Orgado y cols. (2003) demostró que el agonista cannabinoide WIN-55212 tiene un efecto neuroprotector en un modelo de asfixia aguda en ratas recién nacidas, inhibiendo la muerte neuronal temprana a través de mecanismos independientes de receptores CB₁ y la muerte neuronal tardía a través de mecanismos dependientes de receptores CB₁. Además, el WIN-55212 produce una disminución de la liberación de glutamato, inhibiéndose a su vez la liberación de TNF- α y la expresión de iNOS. Este efecto es revertido por ambos antagonistas de receptores, SR1 y SR2, lo cual indica que el efecto es mediado por ambos tipos de receptores cannabinoides (Martínez-Orgado y cols., 2003).

3.- ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington es un desorden motor neurodegenerativo autosómico dominante que se caracteriza por una atrofia progresiva del estriado, debida a la muerte selectiva de las proyecciones neuronales estriatales; y por un deterioro motor que va desde una fase temprana hiperquinética (movimientos coreiformes) a una fase tardía aquinética e incapacitante. Esta enfermedad se debe a la expansión de un triplete CAG, que codifica para el aminoácido

glutamina, en el gen que codifica la proteína denominada huntingtina. Los tratamientos farmacológicos disponibles actualmente se limitan al alivio de los síntomas motores, la depresión mental y las alteraciones comportamentales severas. El tratamiento más frecuente consiste en neurolépticos que producen alivio en un número muy bajo de pacientes con la enfermedad y efectos perjudiciales en la mayoría de los pacientes.

En el año 2000, Glass y cols., realizaron un estudio autorradiográfico para examinar los cambios en los niveles de expresión de los receptores de cannabinoides, dopamina y adenosina en los ganglios basales en cerebros de pacientes con diversos grados de la enfermedad de Huntington e intentar conocer el patrón de degeneración de las neuronas eferentes estriatales. Estos tres tipos de receptores co-localizan en los cuerpos celulares y los terminales axónicos de las neuronas eferentes estriatales que se proyectan hacia el globo pálido y la *substantia nigra*. En este estudio observaron que se produce una disminución de los niveles de los tres receptores, que es mayor en las regiones de proyección que en el núcleo caudado y el caudado putamen. Estos resultados corroboran los estudios realizados previamente por otros autores (Richfield y Herkenham, 1994). Por el contrario, en la *substantia nigra* observaron una disminución de la densidad de los receptores de cannabinoides en los primeros estadios de la enfermedad, que no estaba acompañada por una disminución de los receptores de dopamina, lo cual sugiere que la disminución de los niveles de los receptores de cannabinoides se produce antes de la degradación de los terminales axónicos (Glass y cols., 2000). Estos datos indicaban que los cannabinoides podrían tener una importante función en la progresión de la neurodegeneración que tiene lugar en el cerebro de los pacientes con esta enfermedad.

Los datos en humanos descritos anteriormente coinciden con los de los modelos animales de la enfermedad de Huntington. Existen varios modelos animales que ayudan al estudio de dicha enfermedad, como los ratones transgénicos que expresan una forma mutada de la proteína huntingtina. En

estos ratones se ha observado un descenso del número de receptores CB₁ en ganglios basales en ausencia de muerte neuronal (Denovan-Wright y Robertson, 2000; Lastres-Becker y cols., 2002a).

Otro modelo animal son las ratas en las que se induce la enfermedad mediante la inyección de ácido 3-nitropropiónico, un inhibidor del complejo II mitocondrial que reproduce la deficiencia de este complejo que tiene lugar en la enfermedad de Huntington en humanos. En estos animales también se ha observado la pérdida de receptores CB₁ en ganglios basales (Lastres-Becker y cols., 2002b), y un aumento de los niveles de endocannabinoides en el caudado putamen (Lastres-Becker y cols., 2001b). Además, estos autores demostraron que la administración de agonistas directos de los receptores CB₁, como el CP55940, o inhibidores de la recaptación, como el AM404, son capaces de reducir la hiperquinesia característica de la enfermedad y restablecer los niveles del neurotransmisor GABA.

Más recientemente, se ha desarrollado otro modelo animal que consiste en la inyección de malonato, otro inhibidor del complejo II mitocondrial. En este modelo se ha demostrado que el agonista selectivo de receptores CB₂, HU308, reduce los déficits de GABA producidos por el malonato, y que este efecto es revertido por el antagonista selectivo de este tipo de receptores, SR144528. Además, se observó un aumento de la expresión de receptores CB₂ en células de microglía en el lugar de la lesión inducida por malonato (Arroyo y cols.,). Por tanto, los receptores CB₂ podrían ser una diana terapéutica para mejorar los síntomas asociados a la enfermedad en este modelo.

Hasta la fecha, solo existen tres estudios acerca del uso de los cannabinoides en pacientes con la enfermedad de Huntington. En el primero de ellos, se administró el CBD, un cannabinoide que carece de efectos psicotrópicos, a 15 pacientes y no se observaron mejoras motoras en ninguno de ellos (Consroe y cols., 1991). En el segundo, se administró una sola dosis de nabilona (1.5mg) a un paciente, y se observó un empeoramiento de los movimientos

coreiformes (Muller-Vahl y cols., 1999). El último estudio (Curtis y cols., 2006) se realizó con una sola paciente que presentaba una gran irritabilidad a consecuencia de la enfermedad. En esta paciente se observó que el consumo de cannabis previo a la administración de nabilona (1mg al día) mejoraba la irritabilidad y los síntomas coreicos. Sin embargo, este estudio tiene numerosas limitaciones, ya que se trata de un solo paciente y no se tomaron medidas objetivas durante el uso del cannabis y en el momento en el cual se introdujo el tratamiento con nabilona. Por tanto, se necesita un mayor número de ensayos clínicos para poder establecer el uso terapéutico de los cannabinoides en el tratamiento de la sintomatología de la enfermedad de Huntington.

4.- ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es la más representativa entre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con anomalías del movimiento, con una prevalencia que se incrementa con la edad y que afecta aproximadamente a un 1% de la población a la edad de sesenta y cinco años (Mayeux, 2003). La enfermedad se caracteriza por una lentitud de movimientos, denominada bradiquinesia, rigidez muscular, temblor con movimientos involuntarios de las manos y trastorno del equilibrio, que dificulta la marcha. Todos estos síntomas se deben a una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* que conduce a una denervación del cuerpo estriado (Blandini y cols., 2000).

Desde su introducción en la clínica, la L-3,4-dihidroxifenilalanina (levodopa) ha permanecido como el tratamiento principal para los pacientes con la enfermedad de Parkinson. Aunque la levodopa mejora los síntomas parkinsonianos, su administración a largo plazo está acompañada por fluctuaciones en su duración de acción y complicaciones motoras denominadas disquinesias (Obeso y cols., 2004). Algunos autores proponen que el SCE podría ser una diana terapéutica para tratar las alteraciones motoras asociadas al tratamiento con levodopa (Sieradzan y cols., 2001; Ferrer y cols., 2003; Van der

Stelt y cols., 2005). En roedores, la activación de los receptores de dopamina va acompañada de un aumento de los niveles de AEA en los ganglios basales (Giuffrida y cols., 1999; Ferrer y cols., 2003). El aumento de los niveles de este endocannabinoide actuaría como un mecanismo de retroalimentación inhibitorio que contrarresta las alteraciones motoras mediadas por la dopamina (Giuffrida y cols., 1999; Beltramo y cols., 2000). Este mecanismo inhibitorio desaparece en animales tratados con 6-hidroxidopamina (Ferrer y cols., 2003), una toxina que induce daños en las vías nigroestriatales, lo cual sugiere que las alteraciones en la transmisión del SCE afectan a la interacción de este sistema con la dopamina y provocan las alteraciones motoras. Además, se ha descrito que la administración del agonista cannabinoide WIN55212-2 en este modelo animal mejora las alteraciones motoras provocadas por la levodopa, efecto que es revertido por el antagonista selectivo de receptores CB₁, AM251, lo cual indica que se trata de un mecanismo mediado por este tipo de receptores (Ferrer y cols., 2003).

Como se describió anteriormente, existe un elevado número de receptores de cannabinoides en los segmentos lateral y medial del globo pálido y en la *substantia nigra pars reticulata* (Herkenham y cols., 1991). En estas regiones los receptores se localizan principalmente en los terminales GABAérgicos de proyección al estriado, en los cuales modulan la transmisión disminuyendo la recaptación de GABA desde los terminales eferentes estriatales (Romero y cols., 1998; Maneuf, 1997). La transmisión GABAérgica en el globo pálido se encuentra elevada en los pacientes con la enfermedad de Parkinson (Albin y cols., 1989), mientras que la transmisión en la *substantia nigra* se encuentra disminuida. Los tratamientos antiparkinsonianos basados en terapias dopaminérgicas actúan a nivel del estriado y revierten las alteraciones en la transmisión GABAérgica.

Las neuronas estriatales de la vía directa estriatonigral expresan receptores de dopamina D₁ y se piensa que son activadas por dopamina, mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan receptores de dopamina

D₂ que son inhibidos por dopamina. El tratamiento de ratas con reserpina produce una depleción de noradrenalina, 5-hidroxitriptamina y dopamina (Colpaert y cols., 1987), y genera un síndrome transitorio caracterizado por temblores, rigidez e hipoquinesia. Este modelo animal es muy útil para el estudio de los mecanismos responsables de la enfermedad de Parkinson y ha sido muy utilizado para el desarrollo de nuevos tratamientos antiparkinsonianos (Koller y cols., 1987; Ferre y cols., 1991; Maneuf y cols., 1997). Algunos autores han descrito la disminución de los niveles del ARNm de los receptores CB₁ en el estriado de ratas tratadas con reserpina (Silverdale y cols., 2001). Por otro lado, se sabe que los agonistas de los receptores de dopamina mejoran la aquinesia. El grupo de Maneuf y cols. (1997) observó que el agonista cannabinoide WIN55212-2 reduce el alivio de la aquinesia inducido por los receptores de dopamina D₂, y que este efecto era revertido por la administración del antagonista selectivo de receptores CB₁, SR141716A en el modelo de ratas tratadas con reserpina. Estos resultados indican que la administración conjunta de un agonista de receptores de dopamina D₂ con un agonista cannabinoide podría ser útil para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

La AEA, además de unirse a los receptores CB₁, es capaz de activar receptores TRPV1 (Caterina y cols., 1997; Ross y cols., 2003). Este tipo de receptores, al igual que los receptores CB₁, se expresa en el estriado y el globo pálido (Toth y cols., 2005; Cristino y cols., 2006). El grupo de Morgese y cols. (2007) ha demostrado que el bloqueo de los receptores TRPV1 mediante su antagonista, la capsazepina, en ratas tratadas con 6-hidroxidopamina junto con la administración de inhibidores de la FAAH que producen un aumento de los niveles de AEA, mejora los síntomas disquinéticos producidos por el tratamiento con levodopa. Estos resultados podrían indicar que los receptores TRPV1 están implicados en la fisiopatología de las alteraciones disquinéticas producidas por el tratamiento con levodopa, abriendo nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En humanos, se ha demostrado en estudios postmortem de los ganglios basales que la actividad cannabinoide está hiperactivada en la enfermedad de Parkinson (Lastres-Becker y cols., 2001a), y que este aumento podría ser uno de los mecanismos neurales implicados en la misma. Por tanto, los antagonistas selectivos de los receptores CB₁ podrían ser útiles en el tratamiento de esta enfermedad, retrasando los efectos disquinéticos asociados al tratamiento crónico con levodopa (Brotchie y cols., 2000). Los datos obtenidos a partir de los ensayos clínicos en humanos son controvertidos. Existen datos de ensayos clínicos que demuestran que el tratamiento con nabilona (agonista cannabinoide) es muy efectivo reduciendo las disquinesias en los pacientes con la enfermedad de Parkinson (Sieradzan y cols., 2001). Sin embargo, otro ensayo clínico realizado en años posteriores, no observó mejora de las disquinesias en los pacientes tratados con cannabis frente a los pacientes tratados con placebo (Carroll y cols., 2004). Por tanto, se necesita un mayor número de ensayos clínicos para poder concluir si los compuestos cannabinoides pueden resultar útiles en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

5.- ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y la inducida por el virus de Theiler (TMEV) se utilizan como modelos para estudiar la esclerosis múltiple, ya que poseen características histológicas similares. En ambas enfermedades los linfocitos T se sensibilizan a las proteínas de mielina y generan una respuesta inmune que produce una desmielinización y una inflamación en el SNC (dal Canto y Lipton, 1977). Los resultados obtenidos en estos dos modelos demuestran que los agonistas cannabinoides mejoran los síntomas de la enfermedad. El grupo de Arévalo-Martín (2003) administró WIN55212-2, ACEA o JWH-015 tras la infección con el virus y antes de la aparición de los síntomas, y observó que estos compuestos mejoran la actividad motora, disminuyen la expresión del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase II y el número de células T CD₄ en la médula espinal, y promueven la remielinización. Además, se han observado cambios en la

expresión y función de los receptores CB₁ en la EAE, y cómo la ausencia de estos receptores empeora los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, es necesario hacer estudios con cultivos celulares para conocer mejor las células sobre las que actúan los compuestos cannabinoides.

Algunos autores han propuesto que la espasticidad característica de la esclerosis múltiple mejora con el inhibidor de FAAH, AM374, y con los inhibidores de la recaptación celular de endocannabinoides, AM404, VDM11, OMDM-1 y 2 (Baker y cols., 2001; de Lago y cols., 2004) en la encefalomielitis experimental alérgica crónica y recurrente, un modelo animal de esclerosis múltiple. Además, en estos animales se encuentran aumentados los niveles de AEA y 2-AG en médula espinal y cerebro.

En ensayos clínicos en humanos, también existen datos acerca de la capacidad de los compuestos cannabinoides de mejorar la espasticidad y los temblores de esta enfermedad (Wade y cols., 2003; Zajicek y cols., 2003; Vaney y cols., 2004; Wade y cols., 2004).

6.- ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es la tercera enfermedad neurodegenerativa más común que causa la muerte en edad adulta, después de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Nicholson y cols., 2000). Esta enfermedad se caracteriza por una degeneración de las neuronas de la corteza, el tallo cerebral y la médula espinal (Brown, 1997; Nicholson y cols., 2000). La etiología de la ELA es desconocida todavía, aunque se han propuesto numerosos mecanismos posibles (Cleveland y Rothstein, 2001; Ludolph y cols., 2000; Robberecht, 2000), entre los cuales destacan la vulnerabilidad y susceptibilidad de las neuronas motoras al daño oxidativo y la neuroinflamación (Ludolph y cols., 2000; Robberecht, 2000).

El tratamiento efectivo de la ELA todavía es desconocido. Sin embargo, cada vez existen más datos acerca del posible papel terapéutico que podrían ejercer los compuestos cannabinoides en el tratamiento de esta enfermedad, ya que éstos son capaces de reducir el daño excitotóxico y el daño oxidativo. El grupo de Kim y cols. (2006) ha demostrado que el agonista selectivo de receptores CB₂, AM241, administrado tras la aparición de los síntomas, retrasa la progresión de la enfermedad en ratones transgénicos hSOD1g93A, un modelo de la ELA. Sin embargo, este compuesto no era capaz de alargar la supervivencia de los animales, lo cual podría deberse a que se necesitan dosis mayores del compuesto para ello. Previamente, en este mismo modelo de ratón, el grupo de Raman y cols. (2004) describió que el tratamiento con Δ⁹-THC es efectivo tanto si es administrado antes de la aparición de los síntomas o después, mejorando las alteraciones motoras y aumentando la supervivencia de los animales. Además, observaron que el Δ⁹-THC es muy eficaz reduciendo el estrés oxidativo y excitotóxico *in vitro* en cultivos de médula espinal.

En humanos, el grupo de Yiangou y cols. (2006) observó que en tejido postmortem de médula espinal de pacientes con ELA existían mayores niveles de la enzima COX-2, receptores CB₂ y receptores P2X7 en comparación con la médula espinal de pacientes control, localizados principalmente en células de microglía y macrófagos.

7.- NEUROINFLAMACIÓN POR INFECCIÓN BACTERIANA O VIRAL

Existen numerosos datos que demuestran que los compuestos cannabinoides participan en los procesos inflamatorios, ya que intervienen en procesos como la migración de las células de microglía y modulan la producción de citoquinas. Por tanto, cabe pensar que los cannabinoides podrían jugar un importante papel en procesos inflamatorios generados por infecciones de origen bacteriano o vírico.

La administración sistémica de LPS, un lipopolisacárido de la pared bacteriana, activa de forma potente el sistema inmune innato y se usa como modelo experimental de infecciones sistémicas. Éste induce síntomas como la anorexia, cambios en el umbral nociceptivo y fiebre (Benamar y cols., 2000, 2005; Abe y cols., 2001). La fiebre asociada a la administración de LPS se produce por la síntesis y la liberación de factores pirogénicos como la IL-6, el TNF- α y la proteína inflamatoria de macrófagos (Myers y cols., 1994; Blatteis, 2006). Existen datos que sugieren un papel termorregulador de los ligandos cannabinoides en la fiebre inducida por el LPS. El grupo de Benamar y cols. (2006) observó que dosis no hipotérmicas del agonista cannabinoide WIN55212-2 reducen de forma significativa la fiebre inducida por el LPS, que este compuesto es capaz de reducir los niveles de IL-6, y que este efecto es revertido por el antagonista selectivo de receptores CB₁, SR141716, y no por el antagonista selectivo de receptores CB₂, SR144528. Estos resultados sugieren que la capacidad anti-pirogénica de los cannabinoides está mediada posiblemente por los receptores CB₁ localizados en el hipotálamo (Tsou y cols., 1998), área implicada en la regulación de la temperatura corporal (Moldrich y Wenger, 2000). Además, se ha observado que el pretratamiento con la capsaicina, agonista de receptores vanilloides, bloquea la primera fase de la fiebre inducida por el LPS (Dogen y cols., 2004).

El uso frecuente de marihuana predispone a padecer neumonía de origen bacteriano, infecciones oportunistas y sarcoma de Kaposi en individuos con SIDA (Newell y cols., 1985; Caiaffa y cols., 1994), además de favorecer la progresión de la enfermedad (Tindall y cols., 1988). Existen modelos animales que permiten estudiar la relación entre los compuestos cannabinoides y el virus de la inmunodeficiencia adquirida en humanos (VIH). Un ejemplo es el modelo de ratón huPBL-SCID, desarrollado por primera vez por Mosier y cols. en 1988. Este modelo es un híbrido humano-ratón en el que se implantan leucocitos de sangre periférica humanos a ratones inmunodeficientes, y se considera un buen modelo para estudiar la patogénesis del VIH *in vivo*. El grupo de Roth y cols. (2005) observó, utilizando este modelo, que la administración de THC aumenta

el número de células infectadas por el VIH. Sin embargo, existen ensayos clínicos en humanos con SIDA en los que no se observa un aumento de la carga viral tras la administración oral o inhalada de compuestos cannabinoides (Abrams y cols., 2003).

La infección por el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS-1), un lentivirus que comparte muchas similitudes con el VIH, produce alteraciones cognitivas y motoras (Kolson y cols., 1998; Kolson y González-Scarano, 2000; Williams y Hickey, 2002). La encefalomiелitis inducida por este virus (SIVE) es un buen modelo para el estudio de la enfermedad en humanos ya que simula muchas de las características principales de la misma. El grupo de Benito y cols. (2005) demostró que la expresión de receptores CB₂ se induce en la microglía perivascular como consecuencia de la infección viral. Estos resultados podrían apuntar el posible papel de los receptores CB₂ en la entrada del virus al SNC, ya que la microglía perivascular es uno de los tipos celulares involucrados en este proceso (Williams y cols., 2001b). Además, en este trabajo se describió la presencia de FAAH en astrocitos en el cerebro de los monos infectados por el virus. Estas células regulan la producción de eicosanoides, factor activador de plaquetas, y TNF por los monocitos infectados por el VIH-1 (Minagar y cols., 2002). Por tanto, la presencia de FAAH en este tipo de células podría indicar su participación en estos procesos (Weber y cols., 2004).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.- ASPECTOS GENERALES

El diagnóstico correcto de la enfermedad de Alzheimer (EA) es difícil, aunque hoy en día las principales características de esta enfermedad son bien conocidas. El diagnóstico clínico se basa en la observación de ciertos síntomas como la pérdida de memoria de acontecimientos recientes, la capacidad de razonar, y la de manipular objetos cotidianos. La progresión de la enfermedad conduce a una pérdida completa de la capacidad cognitiva, con total apatía emotiva y desconexión del entorno, siendo la pérdida de las capacidades motoras una de las últimas en manifestarse. La incidencia varía con la edad, incrementándose un 1% por cada año de vida desde los sesenta y cinco a los setenta, y aproximadamente un 6% por cada año más de vida desde los ochenta. Algunos de estos síntomas se aprecian también en otros tipos de demencia como la asociada a Parkinson, la demencia frontotemporal, el alcoholismo en sus últimas etapas, la intoxicación por drogas, la debida a infecciones como sífilis o SIDA, tumores cerebrales, déficits vitamínicos, etc. Sin embargo, las demencias más frecuentes son la de Alzheimer y la asociada con enfermedades cerebro vasculares.

2.- NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Desde el punto de vista neuroanatómico y patológico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una atrofia notable de la corteza cerebral, con aparición de las placas seniles, que son acúmulos extracelulares de diversos compuestos (entre los que destaca el péptido β -amiloide); y de los ovillos neurofibrilares, acúmulos intraneuronales de la proteína Tau hiperfosforilada. Finalmente, también se aprecia una notable pérdida de sinapsis funcionales en el cerebro de estos pacientes.

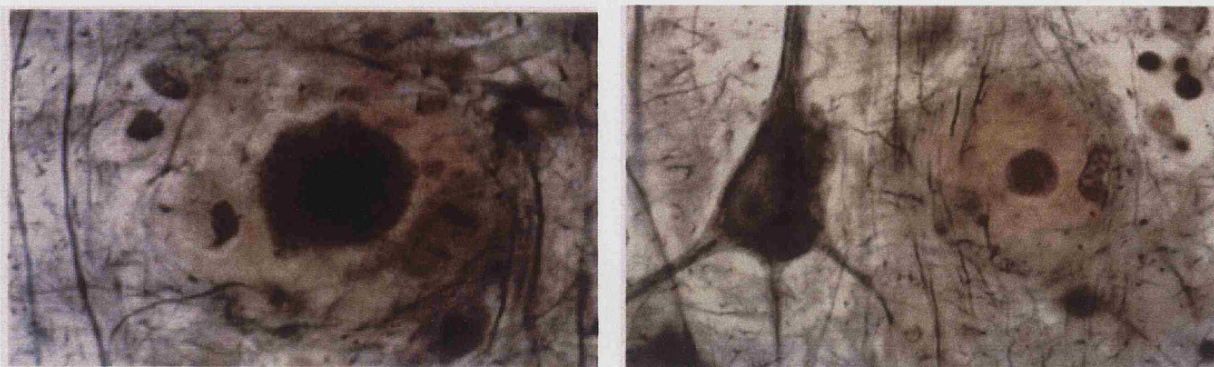


Figura 6.- Placa senil rica en péptido β -amiloide (izquierda) y ovillos neurofibrilares intraneuornales (derecha) (Graeber, 1997)

La abundante presencia de las placas de amiloide en el cerebro de los enfermos fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1907, en el cerebro de una paciente que sufría demencia precoz. Desde un punto de vista morfohistológico, las placas seniles se pueden clasificar en tres categorías: placas difusas, placas neuríticas y placas “burn out” (Dickson, 1997). Las placas difusas no se marcan con el colorante rojo Congo, se encuentran tanto en el cerebro de pacientes de EA como en el de pacientes sanos, y no se asocian con procesos inflamatorios o de degeneración neuronal. Por el contrario, las placas neuríticas se marcan intensamente con el rojo Congo y están rodeadas por células de microglía activada, astrocitos y neuronas en degeneración. Por último, las placas “burnt out” son similares a las placas neuríticas, pero no se suele apreciar reactividad glial asociada a ellas.

La proteína precursora de amiloide (APP) es la proteína que da lugar, tras ser procesada por diversas enzimas, al péptido β -amiloide que forma las placas seniles. En la actualidad conocemos con detalle la estructura y el procesamiento de esta proteína, la localización subcelular de las enzimas implicadas y las causas que inciden en un procesamiento anómalo y posterior acúmulo extracelular de su producto de degradación, el péptido β -amiloide. Sin embargo, existen pocos datos acerca del papel fisiológico desarrollado por la APP y sus péptidos derivados, y sobre su eliminación en situaciones normales en las que no se forman placas extracelulares de amiloide.

A. PROTEÍNA PRECURSORA DE AMILOIDE (APP)

Esta proteína se expresa en muchos tejidos, donde da lugar a diferentes isoformas por procesamiento alternativo del ARN. En las neuronas se encuentra en dendritas, cuerpos celulares y axones, y la isoforma más abundante es la que contiene los 695 aminoácidos (Selkoe, 1999). En esta isoforma se han eliminado el péptido inicial y un péptido localizado en la zona intermedia.

La APP se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso y posee un dominio transmembrana que comprende los aminoácidos del 700 al 723. La zona citosólica de la proteína tiene gran afinidad por la quinesina, que es una molécula que se mueve desde el soma hacia los terminales axónicos. El procesamiento de esta proteína tiene lugar durante el viaje desde el retículo hasta la membrana plasmática, e incluso puede finalizar una vez anclada en la membrana. En las vesículas secretoras aisladas se han encontrado tanto el APP como las enzimas de procesamiento, almacenándose en el lumen del orgánulo los fragmentos procedentes de la proteólisis que serán vertidos al exterior de la célula.

B. LAS ENZIMAS DE PROCESAMIENTO

El procesamiento de la APP requiere tres enzimas y otras proteínas que ayudan a su completo metabolismo (Elser & Wolfe, 2001). Si actúan la α -secretasa y la γ -secretasa se produce un péptido más pequeño que no forma agregados moleculares. Si por el contrario, actúan la β -secretasa y la γ -secretasa, se puede formar el péptido β -amiloide de 42 aminoácidos que forma agregados moleculares y placas de amiloide.

Finalmente, hay que hacer notar que la presencia de estas placas no es exclusiva de los enfermos de Alzheimer, sino que, en estudios postmortem en personas ancianas control, que al fallecer mantenían intactas sus capacidades

mentales, se ha observado que también presentan, en mayor o menor medida, estas placas.

Por otra parte, es un hecho que en la enfermedad de Alzheimer se produce un acúmulo de proteínas fosforiladas, siendo la proteína Tau una de las más abundantes en los ovillos. Generalmente las secuencias de fosforilación incrementadas corresponden a serina o treonina en posición previa a una prolina. Los ovillos neurofibrilares están formados por los filamentos helicoidales pareados (PHFs), formados a su vez por acúmulos de la proteína Tau hiperfosforilada que forma una red filamentosa compacta.

Las principales quinasas implicadas en la fosforilación de Tau son la glucoquinasa sintasa (GSK3 β) y la quinasa dependiente de ciclina (Cdk5). La GSK3 es una serina/treonina quinasa que se activa en respuesta a múltiples estímulos y se incluye en cascadas de señalización relacionadas con el mantenimiento, crecimiento y diferenciación celular. A raíz de estos datos la GSK3 se convirtió en una diana para evitar la formación de acúmulos intracelulares y se desarrollaron una serie de inhibidores. Lo sorprendente es que éstos también eran capaces de reducir la síntesis de los péptidos amiloides en cultivos neurales. Estos inhibidores demostraron que también eran eficaces *in vivo* en ratones transgénicos empleados como modelo de la EA. La Cdk5 es una quinasa dependiente de ciclina. Se ha observado que los inhibidores de este enzima protegen frente a la muerte neuronal y la fosforilación de Tau (De Strooper y Woodgett, 2003; Phiel y cols., 2003).

La zona donde se inicia el depósito de placas de amiloide y de ovillos neurofibrilares es la corteza temporal. Esta zona está internamente conectada con el hipocampo, estructura esencial en la formación de la memoria. Cada hipocampo suele contener alrededor de 9 millones de neuronas y en la etapa final de la enfermedad de Alzheimer el número de éstas suele reducirse en un 84%.

Para los pacientes con edad superior a sesenta y cinco años la enfermedad de Alzheimer representa la octava causa de muerte y afecta entre un 10 y 30% de la población mayor de ochenta y cinco años. Esta disparidad en el porcentaje de afectados depende de si se incluyen o no las formas menos severas de la enfermedad. Estos porcentajes de incidencia dependen de las fuentes consultadas y cada una da diferentes valores, lo que indica también que los límites que existen para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer no están totalmente claros (Martínez-Lage y Moya-Molina, 2002; Mayeaux, 2003). La Asociación Española de Alzheimer indica que existe un 4.3% de la población mayor de sesenta y cinco años que padece la enfermedad en nuestro país.

3.- ASPECTOS GENÉTICOS

La gran parte de los casos de Alzheimer son esporádicos, es decir, su causa última es desconocida, sin embargo los estudios epidemiológicos indican que aproximadamente un 30% de los pacientes tiene algún caso en la historia familiar y aproximadamente un 10% presentan una transmisión autosómica dominante. Los genes implicados en esta enfermedad son cada vez más numerosos, pero se pueden clasificar en dos grandes grupos: genes cuya alteración produce la enfermedad (genes de la proteína precursora de amiloide, presenilina-1 y presenilina-2) y genes que se consideran como factores de riesgo y que aparecen de forma tardía (Migliore y Copedè, 2002; Corder y cols., 2006).

A. GENES DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE

Las mutaciones del gen que codifica la APP, cursan con la aparición de la enfermedad en edad temprana. Los animales genéticamente modificados que sobre-expresan la proteína normal, o las proteínas mutadas de APP, desarrollan placas de amiloide en su cerebro de modo muy prematuro, y son un modelo para el estudio de la enfermedad. El gen de la APP está localizado en el cromosoma 21, lo cual explica el temprano envejecimiento y la formación de placas seniles

en los portadores de la trisomía 21, conocida como Síndrome de Down, tal y como se detallará más adelante (Migliore y Copedè, 2002; Corder y cols., 2003).

B. PRESENILINA-1 Y PRESENILINA-2

Las mutaciones en el gen de la Presenilina-1 (PS1) están asociadas con más de un tercio de los casos de Alzheimer familiar. Este gen se encuentra en el cromosoma 14 y es esencial para el procesamiento de múltiples proteínas de membrana, incluida la APP. Por su parte, las mutaciones del gen de la Presenilina-2 (PS2) son menos abundantes. Este gen se localiza en el cromosoma 1 y es el responsable de la forma autosómica dominante de la enfermedad de Alzheimer en edad temprana. Existe un 67% de homología en la secuencia de aminoácidos entre la presenilina-1 y la 2.

C. GENES QUE CONFIEREN SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

Los genes que confieren susceptibilidad genética son muy numerosos (Corder y cols., 1993; Migliore y Copedè, 2002). Entre ellos destaca el gen de la Apolipoproteína E (Apo E), del que existen tres alelos: el E₃, que es el más común; el E₄, el menos frecuente, pero que está presente en un 50% de los enfermos de Alzheimer tardío; y E₂, que parece conferir cierta resistencia a sufrir la enfermedad.

El gen que codifica la α_2 -macroglobulina presenta polimorfismo genético y algunas de sus variantes aparecen asociadas al Alzheimer tardío. Otros genes con variantes alélicas o polimorfismos que también han sido asociados a esta enfermedad son el de la IL-1, la óxido nítrico sintasa 3 (NOS₃) y el citocromo CYP2D₆.

5.- PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Además de las lesiones neuropatológicas características de la enfermedad de Alzheimer, también se observan numerosos procesos inflamatorios. El desarrollo de anticuerpos específicos, en 1980, permitió identificar la presencia de proteínas del complemento y del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) en la microglía que rodea las placas seniles en pacientes con esta enfermedad. Desde entonces, numerosos estudios confirman la presencia de citoquinas, quimoquinas, proteínas del complemento y otras proteínas asociadas a procesos inmunes e inflamatorios.

A. PAPEL DE LA MICROGLÍA

La activación microglial crónica durante los procesos inflamatorios, está acompañada por la elaboración crónica de citoquinas neuroactivas y otras proteínas, que ponen en marcha un ciclo de citoquinas con consecuencias neurodegenerativas. En este ciclo, la IL-1 es el factor iniciador y coordinador. Esta citoquina promueve la síntesis neuronal y el procesamiento de la APP, favoreciendo la deposición del péptido β -amiloide. Además, la IL-1 activa los atrociitos y promueve la síntesis y la liberación de moléculas inflamatorias y neuroactivas, como por ejemplo, la proteína S100 β , una citoquina que promueve el crecimiento de las neuritas y produce la muerte neuronal a través del aumento de la concentración de calcio en las mismas. El daño neuronal, a su vez, puede activar la microglía aumentando la expresión de IL-1 y produciéndose una amplificación del ciclo de citoquinas (Griffin y cols., 1998). También se ha observado que la IL-1 activa la MAPK p38, quinasa que está relacionada con la fosforilación de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer (Sheng y cols., 2001); y produce una disminución de los niveles de sinaptofisina, proteína que participa en la sinapsis (Li y cols., 2003). Es posible que la IL-1 contribuya a una reorganización del citoesqueleto, produciendo un desensamblaje de los microtúbulos, una desestabilización de los axones y una pérdida de las sinapsis y

de las proteínas implicadas en las mismas (Sheng y cols., 2001). En un estudio realizado con pacientes con EA y individuos sin déficits cognitivos pero con un elevado número de depósitos de β -amiloide, se ha observado que en estos últimos no se produce pérdida de las sinapsis (Lue y cols., 1996). Estos datos sugieren que la inflamación asociada a la EA es la responsable de las alteraciones a nivel neuronal que desencadenan los síntomas característicos de la enfermedad. Los resultados de este estudio concuerdan con los datos de otro estudio en los que se observa que la preincubación de neuronas con IL-1 α , antagonista de receptores de IL-1, suprime el efecto de la microglía activada sobre la síntesis de sinaptofisina neuronal (Li y cols., 2003).

Durante el proceso de envejecimiento no patológico también aumenta el número de células de microglía activada que sobre-expresan IL-1. Estos datos indican que la activación de la microglía se asocia con la edad y no es una consecuencia directa del desarrollo de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. La acumulación de daños en el ADN es un factor que contribuye a la activación microglial asociada al envejecimiento. En los modelos animales de envejecimiento se observa una acumulación de daños en el ADN que es mayor en la corteza cerebral que en otras regiones del cerebro. En el cerebro de humano también se producen daños en el ADN de tipo oxidativo durante el proceso de envejecimiento, y éstos son más marcados en el ADN mitocondrial que en el nuclear. Además, se ha observado que la microglía acumula fragmentos de ADN dañados en el cerebro de pacientes con la EA. La combinación de la fragmentación del ADN y la secreción de péptidos de β -amiloide es la responsable de la activación microglial.

La microglía, a pesar de producir agentes tóxicos bajo ciertas condiciones, tiene como función principal proteger el cerebro. En la enfermedad de Alzheimer es probable que la microglía se encargue de fagocitar y retirar el péptido β -amiloide. Se ha comprobado que las alteraciones de la función microglial y de las respuestas inmunes en el SNC y en la periferia pueden promover el desarrollo de la EA.

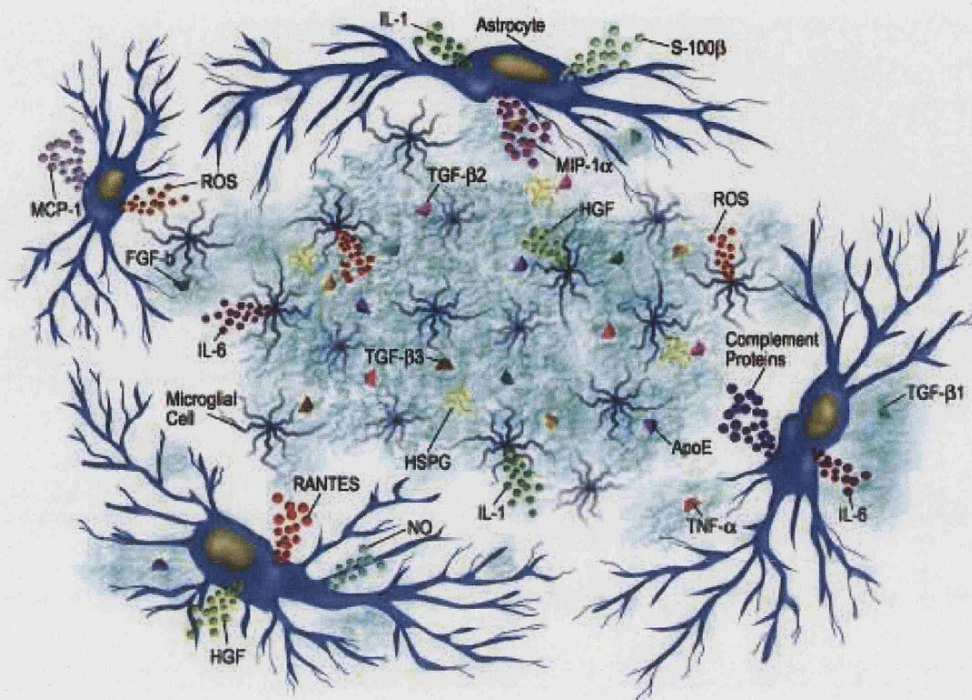


Figura 7.- Procesos neuroinflamatorios que acompañan la enfermedad de Alzheimer (tomada de San Miguel y cols., 2006)

B. PAPEL DE LOS ASTROCITOS

Los astrocitos tienen funciones metabólicas y de soporte muy importantes en el cerebro, entre las que destacan la regulación de la concentración de iones, la formación de la barrera hematoencefálica y la modulación de la actividad sináptica. Además, los astrocitos son capaces de migrar y producir diversas quimoquinas y citoquinas y sus receptores, y tiene actividad fagocítica y proteolítica. Estas células se activan en respuesta a cambios mínimos que se producen en el SNC.

La presencia de un elevado número de astrocitos asociados a los depósitos del péptido β -amiloide, sugiere que estas lesiones son capaces de producir moléculas quimiotácticas que reclutan este tipo de células. Las placas seniles contienen la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), un potente quimiotáctico de astrocitos neonatales *in vitro*, aunque su fuente celular no está

clara. El grupo de Wyss-Coray cols. (2003) demostró que los astrocitos adultos de ratón en cultivo son capaces de migrar hasta las placas seniles ricas en péptido A β en respuesta a distintas moléculas quimiotácticas, y que se unen a las placas a través de un receptor que comparte algunas características con los receptores *scavenger*. Además, observaron que los astrocitos adultos de ratón en cultivo son capaces de fagocitar el péptido β -amiloide inmovilizado y el péptido β -amiloide presente en tejidos de cerebro de ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína APP *in situ*.

Todavía no está claro si los astrocitos reactivos que se acumulan alrededor de las placas seniles tienen una función neuroprotectora o destructiva. Algunos estudios muestran que los astrocitos neonatales de rata son capaces de degradar el péptido β -amiloide (Shaffer y cols., 1995), mientras que otros muestran que los astrocitos neonatales de ratón inhiben la fagocitosis de las placas aisladas de cerebro de pacientes con EA por parte de la microglía (DeWitt y cols., 1998). Además, se necesita un mayor número de estudios para determinar si los astrocitos degradan el péptido β -amiloide de forma intra o extracelular y si se trata de una función normal de este tipo de células de control de la homeostasis dentro del cerebro. El número de astrocitos en cerebro es mayor que el de células de microglía, por lo que los primeros podrían tener una función de retirada de A β más importante de lo que se esperaba. Aunque numerosos estudios muestran que una activación excesiva de los astrocitos promueve la neurodegeneración, el aumento de la capacidad fagocítica de A β de los astrocitos podría constituir una estrategia terapéutica para reducir la toxicidad asociada al A β y la progresión de la EA.

6.- MODELOS TRANSGÉNICOS

Actualmente, existen distintos modelos de animales transgénicos que resultan muy útiles para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. En la siguiente tabla se muestran las principales características de dichos modelos:

Modelo	Región cromosómica	Características
PDAPP	cADN de la APP	Placas difusas y neuríticas, neuritas distróficas, gliosis y menor número de sinapsis.
Tg2576	Doble mutación sueca (K670N y M671L)	Placas difusas y neuríticas, neuritas distróficas y gliosis
APP23	cADN de la APP humana con la mutación sueca	Placas y angiopatía amiloide, déficits de memoria y pérdida neuronal en CA1
PS1 y PS2	Gen de la PS1 o PS2	No desarrollan la patología amiloide
APP/PS1	Gen de la APP y la PS1	Se acelera la formación de placas
3xTg-AD	Genes de la PS1, doble mutación sueca y taup301L	Placas seniles, ovillos neurofibrilares, alteraciones de la plasticidad sináptica (LTP)
KO ApoE	Gen de ApoE	Menores niveles de sinaptofisina
APP/KO ApoE	Gen de la APP y ApoE	Menor número de depósitos de amiloide, placas densas y neuritas distróficas
KO BACE 1	Gen de la BACE 1	No producen el péptido β -amiloide

Tabla 1.- Principales modelos transgénicos de Alzheimer

7.- SISTEMA CANNABINOIDE Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Recientemente, se han publicado trabajos en los que se describe la posible influencia del sistema endocannabinoide en los procesos inflamatorios del cerebro y específicamente en la enfermedad de Alzheimer (Waksman y cols., 1999; Milton, 2002; Walter y cols., 2003; Benito y cols., 2003;). Volicer y cols. (1997) demostraron que el dronabinol, el componente mayoritario de la planta (Δ^9 -THC), preparado en una solución con aceite y administrado de forma oral, mejora el apetito y las alteraciones del comportamiento en pacientes con la EA. Aparte de estos estudios, existen pocos datos clínicos acerca del papel de este sistema en la enfermedad de Alzheimer.

La abundancia de receptores CB_1 en neuronas del hipocampo y la corteza entorrinal abre la posibilidad de que estos receptores puedan mediar el efecto de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria. Se ha observado que el bloqueo de los receptores CB_1 utilizando el SR141716A mejora los déficits de memoria en ratones en los que previamente se ha administrado el péptido β -amiloide.

El grupo de Milton y cols. (2002) ha demostrado que la AEA previene la excitotoxicidad producida por el péptido β -amiloide a través de un mecanismo mediado por receptores CB_1 . Tras la exposición a diferentes péptidos fibrilogénicos, la administración de AEA previene su efecto tóxico en una línea neuronal, y este efecto es revertido por el antagonista selectivo del receptor CB_1 , AM251. Estos datos sugieren que la activación de los receptores CB_1 localizados en neuronas puede tener un papel importante en la protección frente a la neurotoxicidad del péptido β -amiloide.

El óxido nítrico está involucrado en un gran número de enfermedades neurodegenerativas y se produce en grandes cantidades como consecuencia de la formación de los depósitos de β -amiloide (Law y cols., 2001). Waksman y cols.

(1999) observaron que la activación de los receptores CB₁ produce una inhibición de la liberación de óxido nítrico en células de microglía de rata en cultivo. Estos datos sugieren que la modulación de receptores CB₁ puede tener una aplicación terapéutica en algunas enfermedades incluyendo la EA, ya que el NO participa en la formación de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, y en el inicio de la respuesta glial (Law y cols., 2001).

Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha muestran que no existen cambios en la distribución de los receptores CB₁ en el cerebro de pacientes con la EA. Westlake y cols. (1994) observaron cambios en la expresión de los receptores CB₁ en muestras de tejido de pacientes con EA que no son atribuibles al proceso patológico. Además, constataron una disminución de los niveles del ARNm de estos receptores, probablemente debida a la pérdida neuronal que acompaña a la progresión de la enfermedad. Los experimentos realizados en ratas de edad avanzada confirman estos datos (Romero y cols., 1998).

Iuvone y cols. (2004) han observado que el cannabidiol protege las células PC12 expuestas al péptido β -amiloide

SÍNDROME DE DOWN

1.- ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

El Síndrome de Down (SD) es una trisomía del cromosoma 21, que incluye numerosos genes entre los que se encuentran los de la SOD-1, BACE-2, APP y S100 β . La mayoría de las personas con esta enfermedad desarrollan una patología similar a la de la enfermedad de Alzheimer con placas seniles y ovillos neurofibrilares. El péptido β -amiloide comienza a acumularse a los pocos años de vida y sus niveles aumentan con la edad (Leverenz y cols., 1998). A los 30 años aparecen las placas difusas, que se asocian con neuritas distróficas y están formadas por el péptido A β ₁₋₄₂ (menos soluble y tóxico). Los depósitos formados

por el péptido $A\beta_{1-40}$ se desarrollan posteriormente, y aparecen principalmente en placas y en las paredes de los vasos sanguíneos (angiopatía amiloide) (Iwatsubo y cols., 1995). Sin embargo, a los 35-45 años se acelera la aparición de la patología característica de la EA (Wisniewski y cols., 1985).

Los pacientes con SD no expresan niveles elevados de $A\beta$ hasta los 30 años. Por tanto, durante un período largo de tiempo el exceso de $A\beta$ que se produce se elimina a través de las enzimas específicas para la degradación de este péptido. Sin embargo, no existen estudios acerca de los niveles o la distribución de estas enzimas en el cerebro de pacientes con esta enfermedad.

Las placas de β -amiloide se asocian con elevados niveles de marcadores de inflamación, lo que puede deberse al aumento de expresión de determinados genes, ya que hay muchos genes de factores de inflamación que se encuentran en el cromosoma 21. En las placas de estos pacientes también se observan células de microglía activada y un elevado número de astrocitos que expresan la proteína S100 β (Griffin y cols., 1998). Se han encontrado elevados niveles de IL-1, IL-6 y la molécula del complemento C1q en el cerebro de pacientes con SD (Griffin y cols., 1989; Head y cols., 2001; Lemere y cols., 1996; Stoltzner y cols., 2000).

Se han propuesto dos hipótesis para explicar la etiología del SD: la hipótesis del desarrollo inestable, en la que la pérdida del balance de cromosomas es la responsable de la enfermedad; y la hipótesis de la dosis génica, que relaciona la enfermedad con la sobre-expresión de genes.

El cromosoma 21 contiene 255 genes y algunos de ellos están implicados en la patología de la enfermedad (genes candidatos), aunque no se conoce la función de la mayoría de las proteínas codificadas por los mismos. Algunos de estos genes codifican para enzimas como la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), que elimina los residuos de las uniones peróxido. En el cerebro fetal de individuos con SD se encuentra aumentada la actividad de esta enzima,

produciéndose un mayor estrés oxidativo y lipoperoxidación gestacional. También se encuentran en el cromosoma 21 los genes que codifican para la proteína de colágeno IV, cuya expresión provoca alteraciones en la migración neuronal. Por último, se han encontrado elevados niveles de la proteína S100 β , molécula muy importante para la señalización neuronal, la sinaptogénesis y el desarrollo de dendritas. La sobre-expresión de esta proteína en el cerebro fetal puede ser una de las causas del retardo mental característico de los enfermos de SD.

2.- MODELOS ANIMALES

A. MODELOS TRANSGÉNICOS

Los modelos transgénicos se han desarrollado para estudiar el efecto de la sobre-expresión de genes en esta enfermedad. Todos ellos son muy útiles para identificar los denominados genes candidatos implicados en el Síndrome de Down. Sin embargo, ninguno de ellos se asemeja totalmente a la patología en humanos, lo cual indica que además de los genes candidatos existen otros implicados en esta enfermedad. Además, existen genes que son específicos de la especie humana que no se encuentran en estos modelos, enmascarando algunas características fenotípicas de la enfermedad en humanos. De igual forma, los genes específicos de ratón pueden añadir algunas características fenotípicas irrelevantes para el desarrollo de la enfermedad.

En la siguiente tabla se muestran los modelos transgénicos existentes y sus principales características.

Modelos murinos	Región cromosómica	Características
Tg SOD 1	Sod 1 (21q22.1)	Alteración de las uniones neuromusculares y menores niveles de serotonina en plasma
Tg S100b	S100b (21q22.2-22.3)	Desarrollo anormal de dendritas
Tg APP	APP (21q21.3-22.05)	Neuritas distróficas asociadas a placas seniles
Tg Ets2	Ets2 (21q22.3)	Alteraciones craneoencefálicas y braquicefalia
Tg DYRK1	Dyrk1 (21q22.1)	Estructura cerebral anormal y alteraciones motoras
Tg mSim2	Sim2 (21q22.2)	Deficiencias en el aprendizaje

Tabla 2.- Principales modelos transgénicos de Síndrome de Down

B. MODELOS TRISÓMICOS

Modelo	Región cromosómica	Características
Ts16	Cromosoma 16	Menor desarrollo de estructuras cerebrales, enfermedades cardíacas congénitas y período de supervivencia corto
Ts65Dn	Cromosoma 16	Alteraciones de la plasticidad sináptica, degeneración colinérgica, hipertrofia de astrocitos, placas seniles y ovillos
Ts1Cje	Cromosoma 16	Alteraciones del comportamiento y menor volumen cerebelar

Tabla 3.- Principales modelos trisómicos de Síndrome de Down

OBJETIVOS

OBJETIVO 1: Estudio de la distribución de los distintos elementos del SCE en cerebro humano

OBJETIVO 2: Descripción de los cambios de los elementos del SCE en la enfermedad de Alzheimer y modelos animales de la enfermedad

OBJETIVO 3: Descripción de los cambios de los elementos del SCE en el Síndrome de Down y modelos animales

OBJETIVO 4: Posible relevancia funcional de los cambios observados en los elementos del SCE

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MUESTRAS

A. Humanas

Para el estudio de la enfermedad de Alzheimer se utilizaron tejidos de cerebro postmortem de cuatro controles (64-75 años) y siete pacientes con la enfermedad de Alzheimer (68-82 años), con un intervalo postmortem de 12h. Los individuos control carecían de cualquier desorden psiquiátrico o patología. Todos los pacientes con EA cumplían los criterios del CERAD (Consortio para establecer un registro de la EA) y los criterios clínicos y neuropatológicos para el diagnóstico de esta enfermedad (Mirra et al., 1991). El diagnóstico de la EA también se confirmó con diversas tinciones específicas, como el Gallyas (Uchihara y cols., 2005) o la plata-metenamina (Haga y cols., 1994). Todas estas muestras se obtuvieron del Banco de Tejidos para Investigación Neurológica (BTIN).

En las muestras citadas, se separaron los dos hemisferios cerebrales, procediendo a la congelación inmediata de uno de ellos para la posterior realización del *Western blot* y la medida de la actividad de la FAAH; mientras que el otro se fijó para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas. En cada caso, uno de los hemisferios se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4%, y se seleccionaron pequeños bloques de tejido de cada una de las áreas de interés (hipocampo y cortezas parahipocampal y entorrinal). Las distintas áreas se transfirieron a una solución de KPBS 50mM (fosfato potásico) y se cortaron en un vibratomo (Leica). Se seleccionaron las áreas del hipocampo y las cortezas porque son áreas ricas en placas neuríticas y depósitos de β -amiloide en la EA (Morrison and Hof, 2002). Las secciones de 50 μ m se utilizaron para técnicas inmunohistoquímicas y distintas tinciones.

Para el estudio del Síndrome de Down se obtuvo el cerebro de pacientes con el Síndrome de Down (6 días, 3 y 8 meses, 8, 9, 34, 48 y 51 años) e

individuos control (30 semanas de gestación, 29 y 58 años). Estas muestras fueron donadas por la Dra. Sue Griffin del *Donald W. Reynolds Center on Aging* de la Universidad de Arkansas. Posteriormente, se fijaron en paraformaldehído al 4%. Se diseccionaron las áreas de interés (corteza e hipocampo) y se embebieron en parafina, para después ser cortados en secciones de 4µm con un microtomo (Leica). Estas secciones se utilizaron para la realización de técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se escogieron estas áreas, porque, al igual que ocurre en la enfermedad de Alzheimer, son las áreas con mayor contenido de placas neuríticas.

Para el estudio de la relevancia funcional de los cambios observados en los elementos del SCE se utilizaron secciones de cerebro congelado de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y cortados en un criostato a 10µm de grosor. El diagnóstico de la enfermedad se realizó mediante técnicas específicas de tinción como el Gallyas o la plata metenamina y por las observaciones neuropatológicas. Las secciones contenían un elevado número de placas seniles ricas en el péptido β -amiloide.

B. Ratones

Se utilizaron ratones transgénicos 3xTg-AD, los cuales expresan las mutaciones en los genes de la PS1, la doble mutación sueca y la taup301L, fueron cedidos por el Dr. Frank La Ferla y mantenidos en el laboratorio de la Dra. Lidia Jiménez Llorca en la Universidad Autónoma de Barcelona. Se extrajeron cerebros de ratones transgénicos de 3-15 meses y de ratones control de las mismas edades. A continuación, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS, se lavaron con KPBS 50mM y se cortaron con un vibratomo (Leica) en secciones de 30µm. Las secciones se transfirieron a KPBS para realizar las técnicas de inmunohistoquímica y las tinciones específicas. También se obtuvieron cerebros de ratones transgénicos y controles de las mismas edades citadas anteriormente para congelar a -80°C y realizar RT-PCT.

Por otro lado, se obtuvieron los cerebros de los ratones transgénicos Ts65DN (presentan la trisomía del cromosoma 16) y los ratones control de distintas edades (8, 10, 14, 16 y 19 meses). Estas muestras fueron cedidas por la Dra. Sue Griffin del *Donald W. Reynolds Center on Aging* de la Universidad de Arkansas. Los cerebros se fijaron en paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina y se realizaron bloques para después cortar secciones de 4µm en un microtomo. Estas secciones se utilizaron para la realización de técnicas inmunohistoquímicas. También se obtuvieron los cerebros de ratones transgénicos y control para congelar y posteriormente extraer el ARN para la realización de RT-PCR.

C. Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares distintas: la línea de astrocitoma humano denominada U373 MG (American Type Culture Collection, Barcelona) como modelo de astrocitos; y la línea THP-1 (*American Type Culture Collection*, Barcelona) diferenciada a macrófagos, como modelo de células de microglia activadas con capacidad fagocítica. Las células THP-1 se diferenciaron a macrófagos incubando con el compuesto PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) a una concentración de 100 nM durante 24h. Posteriormente, se retira el PMA y se dejan en quiescencia durante 24 h antes de ser usadas.

2.- INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

Inmunohistoquímica. El protocolo que se utilizó es el descrito previamente por Tsou y cols. (1998a) y Romero y cols. (2002). Las secciones de parafina fueron sometidas a un proceso de desparafinado, por inmersión en orden sucesivo en xilol, etanol 100°, etanol 96° y agua. Este proceso sirve para eliminar los restos de parafina que pueden interferir con el marcaje posterior e hidratar las secciones.

Las secciones de tejido se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico (Shi et al., 2001). Se colocaron las secciones en una olla a presión con una solución hirviendo de citrato sódico 0.01M pH 6 durante 2 min. Posteriormente, se dejan atemperar las secciones a temperatura ambiente, se lavan con KPBS y se incuban con una solución bloqueante de la peroxidasa endógena (Dako), durante 30 min. a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones con KPBS y se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos usados son los que se detallan en la siguiente tabla:

Anticuerpos	Dilución	Diana
Anti-CB ₁ policlonal (Affinity Bioreagents)	1:500- 1:2000	Receptor CB ₁
Anti-CB ₂ policlonal (Affinity Bioreagents)	1:500- 1:1500	Receptor CB ₂
Anti-FAAH policlonal (Romero et al., 2002)	1:100- 1:1000	Enzima FAAH
Anti-CD68 monoclonal (Dako)	1:100	Microglia
Anti-GFAP monoclonal (Dako)	1:200	Astrocitos
Anti- β -amiloide monoclonal (Dako)	1:200	Péptido β - amiloide

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las secciones en KPBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes (1:200), durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron de nuevo las secciones en KPBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina (Vector Elite), durante 1h a temperatura ambiente. Para visualizar la reacción, se incubaron las secciones en una solución con un 0.01% de H₂O₂, 2.5% de sulfato de níquel y 0.04% de DAB (diaminobencidina) (Dako), obteniéndose un color morado/negro.

Para los estudios de doble marcaje, las secciones se incubaron de forma secuencial con el anticuerpo anti-FAAH, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, excepto que el marcaje se visualiza con DAB en ausencia de sulfato de níquel (obteniéndose un color marrón); seguida de la incubación con el anticuerpo monoclonal anti- β -amiloide (1:200, Dako). En este caso, el marcaje se visualizó con el kit Vector Elite SG, obteniéndose un color azul. Se siguió el mismo protocolo para los experimentos de doble marcaje CB₂/A β y FAAH/A β .

Las secciones se montaron en portaobjetos tratados con gelatina, se deshidrataron y se sellaron con cubreobjetos. Las observaciones y las fotografías se realizaron con el microscopio Nikon Eclipse E600 y la cámara Nikon FDX-35.

Los controles para demostrar la especificidad de los anticuerpos utilizados, se realizaron mediante la preabsorción y la co-incubación de los anticuerpos con los correspondientes péptidos de bloqueo (CB₁, proteína de fusión contra los aminoácidos 1-100 del CB₁ humano a 5 μ g/ml; CB₂, proteína de fusión contra los aminoácidos 1-33 del CB₂ humano a 5 μ g/ml; FAAH, proteína de fusión contra los aminoácidos 561-579 de la FAAH de rata a 1.25 μ g/ml), o mediante la incubación en ausencia de anticuerpo primario.

Para realizar el marcaje inmunohistoquímico del péptido β -amiloide en los tejidos incubados con cultivos celulares, se retira el medio y se lavan los tejidos situados en las placas tres veces con EDTA 0.5M pH 8 a 37°C para eliminar las células pegadas al tejido. Posteriormente, se realizan dos lavados de 5 min. cada uno con PBS pH 7.4 y se pasan los tejidos por ácido fórmico al 70% en agua. Este tratamiento con fórmico sirve para cambiar la configuración del péptido amiloide y facilitar su detección por el anticuerpo. A continuación, se lavan los tejidos tres veces con PBS y se incuban con paraformaldehído al 4% 30 min. en hielo, para obtener una mejor fijación del tejido. Los tejidos se lavan con PBS y se bloquea la peroxidasa endógena incubando con una solución comercial bloqueante de peroxidasa (Dako) durante 30 min. a temperatura ambiente. Se

realizan tres lavados con PBS y se incuban los tejidos con el anticuerpo anti- β -amiloide (Dako) durante 90 min. a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavan los tejidos con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Vector Elite) durante 1h a temperatura ambiente, seguido de la incubación con el complejo avidina-biotina (Vector Elite) durante 1h a temperatura ambiente. Por último, se lavan los tejidos con PBS, y se incuban con una solución comercial que contiene un 0.01 % de H_2O_2 , a la que se añade un 2.5% de sulfato de níquel y un 0.04% de DAB, obteniéndose un marcaje morado. Los tejidos se deshidratan y se obtienen fotografías con el microscopio para poder cuantificar el número de placas de β -amiloide.

Inmunofluorescencia. Las técnicas de inmunofluorescencia se llevaron a cabo para identificar poblaciones celulares específicas. Las secciones de parafina se lavaron con TBS, se sometieron al desenmascaramiento antigénico y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (se detallan a continuación), durante toda la noche a 4°C.

Anticuerpos	Dilución	Diana
Anti- CB_2 policlonal (Affinity Bioreagents)	1:100	Receptor CB_2
Anti-FAAH policlonal (Romero et al., 2002)	1:50	Enzima FAAH
Anti-HLA-DR monoclonal (Dako)	1:50	Microglía
Anti-GFAP monoclonal (Dako)	1:500	Astrocitos

Posteriormente, se lavaron las secciones con TBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa 488 (verde), para los anticuerpos policlonales, y Alexa 546 (rojo), para los anticuerpos monoclonales, durante 2h a 37°C. Por último, se lavaron las secciones en TBS y se sellaron con medio de montaje acuoso. Las observaciones y las fotografías se realizaron con el microscopio (Nikon Eclipse 90i).

Se llevaron a cabo experimentos de doble marcaje para los anticuerpos CB₂/HLA-DR y FAAH/GFAP.

3.- WESTERN-BLOT

El protocolo usado ha sido descrito anteriormente (Romero et al., 2002). El cerebro se obtuvo a partir de una autopsia, y se utilizó 1gr. de la sustancia gris cortical para homogenizar en 10ml del reactivo M-PER (reactivo de extracción de proteínas de mamífero) (Pierce, Rockford, IL). Posteriormente, se agita el homogeneizado y se centrifuga a 27.000xg durante 15 min. Tras la centrifugación se aisló el sobrenadante y se determina la cantidad de proteínas en el extracto mediante un BCA siguiendo las indicaciones del fabricante (Pierce).

El extracto de proteínas (50µg) se desnaturalizó y separó mediante electroforesis (Laemmli, 1970) en un gel de poli-acrilamida al 15%, de 10.5x10 cm de tamaño y 0.75 mm de grosor. Después de la separación, se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó en PBS con un 0.2% de Tween-20 (PBST), y se incubó con una solución de PBS y un 2% de leche en polvo desnatada (Fluka) durante toda la noche a 4°C para evitar las uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-CB₁, anti-CB₂ y anti-FAAH descritos en el apartado anterior) a una dilución 1:300 en PBST con un 2% de leche en polvo desnatada (Fluka), durante toda la noche a 4°C. Después de lavar la membrana con PBST, se incubó con un anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (Sigma, St Louis, MO), a una dilución 1:2000 en PBST con un 2% de leche en polvo desnatada, durante 1h a temperatura ambiente. Por último, se lavó la membrana con PBST y PBS, y se incubó con el cromógeno NBT/BCIP para visualizar el complejo inmune. Para determinar la especificidad de los anticuerpos utilizados, en algunos experimentos se incubaron los anticuerpos con 8µg/ml de los péptidos de bloqueo usados para generar los mismos.

4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA FAAH

Las secciones de tejido congelado se cortaron en un criostato y se tiñeron con azul de metileno. Se diseccionaron placas neuríticas individuales de las cortezas parahipocampal y entorrinal con la ayuda de un microscopio, y se transfirieron a PBS. De igual forma, se obtuvieron secciones de tejido de cerebro de pacientes control. Se homogenizaron las placas en 50µl de Tris (50mM, pH 7.4) con EDTA (1mM) y MgCl₂ (3mM). Los lisados se incubaron con [¹⁴C]AEA (2000dpm) durante 15 min. Durante la incubación se uso cloroformo/metanol (1:2) como secuestrante. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción según el protocolo descrito por Edgemon et al. (1998). Los controles se obtuvieron incubando en ausencia de tejido. La actividad de FAAH se determina midiendo la cantidad de AEA que es hidrolizada.

5.- RT-PCR

Extracción de ARN de cerebro de ratón 3xTg-AD. Se extrae el ARN de la corteza y el hipocampo (10-20 mg de tejido), áreas en las que se acumula el mayor número de placas del péptido β-amiloide, mediante el kit MasterPure Complete DNA and RNA purification (Epicentre Biotechnologies, Madison, Wisconsin. Para homogenizar se diluyen 2 µl de proteinasa K (50 µg/µl) en 600 µl de buffer de lisis para cada muestra y se incuban a 65°C 15 min. agitando con vórtex cada 5 min. A continuación se incuban las muestras en hielo durante 3-5 min., se añaden 300 µl del reactivo de precipitación y se agita con un vórtex 10 seg. Se centrifugan las muestras a 14000 rpm durante 10 min. y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Posteriormente, se añaden 1000µl de isopropanol y se mezcla por inversión 30-40 veces. Se centrifuga a 4°C, 10 min. a 14000 rpm y se descarta el sobrenadante.

Para eliminar restos de ADN que pueden quedar tras la extracción, se tratan las muestras con DNaseI RNase-free durante 30 min. A continuación, se

añaden 400 µl de 2x T y C Lisis Solution y se agita con vórtex durante 5seg. Se añaden 400 µl de MPC, se agita con vórtex 10 seg., se incuban las muestras en hielo 3-5 min. y se centrifuga 10 min. a 10000xg. Tras la centrifugación se recoge el sobrenadante, se añaden 1000 µl de isopropanol y se mezcla por inversión 30-40 veces. Se centrifuga a 4°C 10 min. a 14000 rpm, se retira el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 75% dos veces. Por último, se resuspende el ARN en 10-35 µl de H₂O-DEPC.

Posteriormente, se corre un gel desnaturalizante para comprobar que el ARN no se haya degradado en ninguno de los pasos anteriores. Para preparar el gel se mezclan 0.6g de agarosa con 45ml de H₂O-DEPC y se calienta en un microndas hasta que esté completamente disuelto. Posteriormente, se deja enfriar hasta 65°C y se añaden 5ml de MOPS 10x, 1.8ml de formaldehído al 37% y 1µl de bromuro de etidio. Las muestras se mezclan con buffer de carga, se calientan a 65°C durante 5min. y se ponen en hielo antes de cargarlas. La cuantificación de la cantidad obtenida se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm, y se estimó su pureza mediante el cociente de la absorbancia a 260 y 280 nm. Las muestras cuyo cociente no se encontraba en el rango 1.7 a 2.1 fueron desechadas.

Extracción de ARN de cerebro de ratón Ts65DN. Se realiza la extracción de ARN total siguiendo el protocolo descrito en el kit TRI REAGENT (Molecular Research Center Inc.). Se añade 1ml de Tri Reagent a 100 mg de tejido y se homogeniza en un tubo de 5ml. Posteriormente, se incuba el homogenado 5min. a temperatura ambiente para permitir una mejor disociación de los complejos nucleoproteicos. Tras la homogenización, se retira el material insoluble mediante centrifugación a 12000xg 10 min. a 4°C. A continuación, se retira el sobrenadante y se coloca en un tubo nuevo en el que se añaden 0.2ml de cloroformo. Se agita en el vórtex, se incuba 10min. a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000xg 15min. a 4°C. Tras la centrifugación, se coloca la fase acuosa en un tubo limpio y se añaden 0.5ml de isopropanol. Se mezcla bien, se incuba 10min. a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000xg 8min. a 4°C. Se

elimina el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet, y éste se lava con etanol 75%. Se centrifuga a 7500xg 5min. a 4°C y se elimina el sobrenadante. Se deja secar el pellet durante 5-10min. a temperatura ambiente, se resuspende en H₂O-DEPC y se almacena a -80°C.

Para eliminar los posibles restos de ADN que queden tras la extracción del ARN se trata con la enzima DNaseI. Para ello se usa el protocolo descrito por Roche. Los tubos se incuban en el termociclador (37°C, 30 seg., 37°C, 5 min., 70°C, 10 min., 4°C, ∞).

Posteriormente, se corre un gel desnaturalizante para comprobar que el ARN no se haya degradado en ninguno de los pasos anteriores. El gel y la cuantificación se realizaron conforme a lo descrito previamente.

RT-PCR de muestras de ratón 3xTg-AD. La reacción de retrotranscripción se realizó con 2 µg de RNA siguiendo las instrucciones del kit de First Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La mezcla contenía tanto *random primer* como oligo-dT. Las muestras se incuban en el termociclador 10 min. a 25°C, 60 min. a 42°C, 5 min. a 99°C y ∞ a 4°C.

RT-PCR de muestras de ratón Ts65DN. Se utiliza el protocolo indicado en el kit ABI RT para PCR. La cantidad de ARN utilizada son 2µg.

Los tubos se incuban en el termociclador con 3 ciclos distintos: (1) 25°C, 10min., (2) 37°C, 60min., (3) 95°C, 5min..

PCR. Se realiza una PCR cuantitativa para medir la expresión del ARNm de los receptores CB₁ y CB₂ y la enzima FAAH. Como control interno se usa el gen del ARN 18S. Los primers utilizados son los siguientes:

PRIMER	SECUENCIA	T _m
CB₁-Rata Sense	CATCATCATCCACACGTCAG	60
CB₁-Rata Antisense	ATGCTGTTGTCTAGAGGCTG	60
CB₁-Ratón Sense	GCGGCTGACAAATGACAC	55
CB₁-Ratón Antisense	CGGGAGGACAGGATAATATAGAG	53.8
FAAH-Rata Sense	TCCAAGAGCCCAGGAGGTTC	64
FAAH-Rata Antisense	AAGCTGCACTGCCGTCTGTC	64
18S-Left Primer	AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC	59
18S-Right Primer	GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA	59

La PCR se realiza con el LighCycler 3 de Roche y las condiciones y el kit utilizados son específicos para cada gen.

PCR para CB₁ y FAAH. Se lleva a cabo con el kit para PCR de Roche LightCycler-FastStart ADN Master SYBR Green I. Las condiciones de PCR para cada gen son las siguientes:

CB₁: Desnaturalización: 95°C, 10 min.

Amplificación: 95°C, 10 seg., 57°C, 4 seg., 72°C, 13 seg. (45 ciclos)

Melting: 63°C, 20 seg.

Cooling: 40°C, 30 seg.

FAAH: Desnaturalización: 95°C, 10 min.

Amplificación: 95°C, 10 seg., 60°C, 5 seg., 72°C, 8 seg. (55 ciclos)

Melting: 66°C, 40 seg.

Cooling: 40°C, 30 seg.

PCR para CB₁. Se utiliza el kit para PCR de Roche LightCycler FastStart ADN Master HyProbe. Este kit incorpora dos sondas de hibridación fluorescentes, que hibridan con una región de los productos amplificados durante la fase de annealing. Las sondas utilizadas son las siguientes:

SONDA	SECUENCIA	T _m
Cn2 FL	TTCTGTCTCCCGGCATCCCTCCA	68
Cn2 LC	GGATGGGCTTTGGCTTCTTCTACTGGAGCT	71

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

CB₂: Desnaturalización: 95°C, 10 min.

Amplificación: 95°C, 10 seg., 59°C, 20 seg., 72°C, 9 seg. (45 ciclos)

Melting: 64°C, 30 seg.

Cooling: 40°C, 30 seg.

PCR para 18S. Se utiliza el kit de Roche LightCycler TaqMan Master y la sonda #55 (Use Universal probelibrary, Roche).

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

18S : Desnaturalización: 95°C, 10 min.

Amplificación: 95°C, 10 seg., 60°C, 30 seg., 72°C, 1 seg. (45 ciclos)

Melting: 64°C, 30 seg.

Cooling: 40°C, 0 seg.

6.- CULTIVOS CELULARES

Mantenimiento de los cultivos. Las células se plaquean en frascos de cultivo con 35 ml de medio de cultivo específico para cada tipo celular (para U373MG se utiliza DMEN (Biowittaker) con 4.5mg/l de glucosa, 1mM de piruvato sódico, 3.7mg/l de CO₃HNa, 2mM Glutamina, 10%FBS (suero fetal bovino) (Biowittaker) y 50 U/ml de Penicilina/Streptomycin (Biowittaker); para THP-1 se utiliza RPMI 1640 (Biowittaker) con 1mM de Piruvato sódico, 0.05mM de

2-mercaptoetanol (Sigma), 1.25 g de Glucosa, 10% de FBS (Biowittaker) y 50 U/ml de Penicilina/Streptomycin (Biowittaker)), y se incuban a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ saturada de humedad hasta confluencia. Posteriormente, se retira el medio de cultivo y se lavan con PBS para eliminar los restos de suero del medio. Se incuban en presencia de tripsina 1x a 37°C durante 5 min. para despegarlas del frasco y se centrifugan a 800 rpm durante 5 min.. Se elimina el sobrenadante y se realiza un conteo de células para posteriormente resuspenderlas en medio y plaquearlas a la densidad adecuada.

Experimentos de fagocitosis. Se colocaron los portaobjetos con los tejidos de pacientes con Alzheimer en placas de cultivo p35 estériles con 1.5 ml del medio de cultivo específico para cada tipo celular mencionado anteriormente. A continuación, se plaquean las células sobre los tejidos a una densidad de 200.000 células/placa y se incuban a 37°C y con un 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, se lavan las placas con PBS, se añade medio sin suero y se añaden los compuestos específicos cuya actividad se desea comprobar, a la concentración deseada. Para comprobar si los vehículos en los que se encuentran disueltos los compuestos tienen alguna actividad sobre las células y poder distinguir dicha actividad de la del propio compuesto, se añade el vehículo en las placas control. De igual forma, para conocer la capacidad fagocítica de las células por sí mismas, se utilizan placas en las que no se añade ni el compuesto ni el vehículo. Las células se incuban durante 24h con los distintos compuestos y, posteriormente, se realizan técnicas inmunohistoquímicas para cuantificar el número de placas presentes en los tejidos de pacientes con Alzheimer, y poder comparar el efecto de los distintos compuestos sobre la actividad fagocítica de los distintos tipos celulares.

Los compuestos utilizados se detallan a continuación:

Compuesto	Concentración	Tipo de compuesto
JWH-015	1, 5, 10 y 100 nM	Agonista CB ₂
SR144528	25nM	Antagonista CB ₂

Ensayo de la LDH. Para descartar que una menor capacidad fagocítica se deba a la muerte celular y no a la acción del compuesto sobre las células, se recoge medio a distintos tiempos y se lleva a cabo la medida de los productos de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Las células en cultivo al morir liberan la enzima LDH al medio, por lo que se trata de un buen método para cuantificar la muerte celular en cultivo. Este enzima cataliza la siguiente reacción: $\text{Pyr} + \text{NADH} \longrightarrow \text{Lactato} + \text{NAD}^+$. Con este método se mide la desaparición de NADH por el cambio de absorbancia a 340nm. Para ello, 0.6 mg de NADH (Sigma) se disuelven en una solución de piruvato sódico (1.8mM) y tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0.1M, pH 7.4). Se mezclan 50 μ l de muestra con 50 μ l de la mezcla anterior en una placa de ELISA y se mide la absorbancia a 340nm.

7.- CUANTIFICACIÓN DE PLACAS DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE

7.1.- Área relativa de placas

Para cuantificar el número de placas presentes en los tejidos se realizaron fotografías de las secciones de tejido con el objetivo 1x en un microscopio Nikon 90i y la cámara DXM1200F acoplada al mismo. El área relativa de placas se obtiene dividiendo el área total ocupada por placas entre la superficie total de la sección de tejido.

7.2.- Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm SEM del número de experimentos. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con el test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos. El análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 11.0.0 del programa SPSS (SPSS Inc.).

RESULTADOS



1.- LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN CEREBRO HUMANO

El objetivo de este bloque experimental fue determinar la distribución a nivel celular de los distintos elementos del SCE en cerebro humano sano, e interpretar el significado funcional de su presencia en los distintos tipos celulares. La distribución celular de los receptores CB₁, CB₂ y FAAH ha sido descrita previamente en el cerebro de diversas especies animales, pero existen pocos datos acerca de su distribución en humanos.

1.1.- Receptores CB₁

La presencia de receptores CB₁ en cerebro se confirmó mediante *Western blot* a partir de un homogeneizado de cerebro, en el cual se obtuvo una banda de 50kDa (Figura 2R, línea 1), lo cual coincide con el peso molecular esperado para los receptores CB₁. No se observa señal tras la incubación del anticuerpo primario con el péptido de bloqueo, confirmando la especificidad del anticuerpo utilizado (Figura 2R, línea 2).

En general, la distribución de los receptores CB₁ en SNC fue similar a la descrita previamente por otros autores mediante técnicas autorradiográficas (Herkenham y cols., 1990; Glass y cols., 1997). Dicha distribución también fue coincidente con la descrita en otras especies de mamíferos, como la rata o el ratón (Tsou y cols., 1998). Aunque la inmunohistoquímica no es una técnica cuantitativa, sí permite distinguir variaciones en la densidad de receptores en distintas áreas. Así, los receptores CB₁ son especialmente abundantes en áreas implicadas en el control motor, como la corteza motora, el caudado putamen, el globo pálido, la *substancia nigra pars reticulata* y el cerebelo (Figuras 1A-I y 2). Como se puede observar en la Figura 2, su expresión es menor en áreas como el hipocampo, el tálamo y el hipotálamo, y muy baja en áreas del cerebro medio y la médula espinal.

En la corteza, los receptores CB₁ se localizan en las células piramidales de las capas III, IV y V y en las interneuronas de la capa VI (Figuras 1A y B). En hipocampo, se encontró un marcaje intenso en las células piramidales (Figura 1C-E). En la región del caudado-putamen se puede observar un marcaje neuropílico (Figura 1F) y en el globo pálido un marcaje en forma de red (Figura 1G). La *substantia nigra* también revela una abundante presencia de este tipo de receptores tanto en los cuerpos celulares como en fibras (Figura 1H,I). En el cerebelo, el marcaje se localiza tanto en los cuerpos celulares como en las dendritas de células granulares y de Purkinje (Figura 2J).. Por el contrario, el marcaje fue menor en las células del núcleo mamilar del hipotálamo (Figura 2K,L), en los cuerpos celulares de los núcleos olivar inferior y dentado (Figura 2M,N y 2O, respectivamente), y en las neuronas motoras del asta anterior de la sustancia gris de la médula espinal (Figura 2P,Q).

La especificidad de los anticuerpos utilizados para los estudios inmunohistoquímicos se corroboró tras la incubación con el péptido de bloqueo, tras la que no se observa marcaje.

1.2.- Receptores CB₂

En primer lugar, se realizó un *Western blot* para confirmar la presencia de receptores CB₂ en homogeneizado de cerebelo humano (Figura 4C, línea I). La incubación con el péptido de bloqueo revierte la señal, confirmándose la especificidad del anticuerpo utilizado (Figura 4C, línea II).

Frente a la abundante presencia de los receptores CB₁, los receptores CB₂ se expresan en niveles mucho menores en el SNC humano. Así, los estudios inmunohistoquímicos revelaron que los receptores CB₂ se expresan en áreas perivasculares, siendo más abundantes en porciones de la sustancia blanca, incluyendo vasos sanguíneos de gran y pequeño calibre (Figuras 3A,B,D). A mayor aumento se observa que la superficie externa de los vasos sanguíneos presenta un marcaje punteado, que corresponde a células con morfología de

células de microglia que se encuentran “abrazando” la superficie más externa de la pared de los vasos sanguíneos (Figura 3C). No se observa marcaje en el resto del parénquima tisular ni en elementos neuronales del núcleo dentado.

La especificidad del anticuerpo utilizado se comprobó mediante la incubación con el péptido de bloqueo, tras la cual no se observó ningún tipo de marcaje.

Para determinar qué tipo de poblaciones celulares expresaban este tipo de receptores se llevaron a cabo estudios de doble marcaje con marcadores fenotípicos característicos de microglía. Estos estudios revelan que las células positivas para CB₂, también son positivas para el marcador HLA-DP, DQ y DR, confirmando que se trata de células de microglía (Figuras 4A,B). Además, el marcaje se limita a las células de microglía perivascular y no se observa en otros tipos de células de microglía.

1.3. FAAH

La presencia de FAAH en el cerebro de pacientes sanos se confirmó mediante *Western blot*, el cual puso de manifiesto una banda de 50kDa correspondiente al enzima (Figura 6V, línea 1), confirmando los datos obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos. La señal fue revertida tras la incubación del anticuerpo con el péptido de bloqueo (Figura 6V, línea 2).

La distribución de FAAH fue muy similar a la encontrada para los receptores CB₁. Los estudios inmunohistoquímicos revelan que los mayores niveles de marcaje se encuentran en la corteza, el caudado putamen, el globo pálido, la *substantia nigra pars reticulata* y el cerebelo; mientras que se encuentran niveles de marcaje moderados en hipocampo, hipotálamo y médula espinal.

En todas las regiones corticales estudiadas, el marcaje más intenso para FAAH corresponde a los cuerpos celulares y procesos de las neuronas

piramidales (Figuras 5A,B). También se observó marcaje en pequeños elementos no piramidales de la corteza. De forma llamativa, se observó un intenso marcaje en fibras perivasculares de la sustancia gris y blanca. A diferencia del marcaje obtenido para los receptores CB₂, el marcaje de FAAH se localiza en las terminaciones astrocitarias que se extienden hacia la pared de los vasos sanguíneos. Este marcaje es más evidente en la sustancia blanca donde se pueden apreciar cuerpos y procesos astrocitarios positivos para FAAH (Figura 5C).

En el hipocampo, se observó un marcaje moderado de células piramidales, más intenso en las regiones CA1 y CA4 (Figuras 5D,E), y de neuronas del giro dentado predominantemente en secciones dendríticas (Figura 5F).

En los ganglios basales, se apreciaba un marcaje homogéneo en fibras del núcleo caudado y del caudado putamen, que reflejaban un marcaje neuropílico (Figura 5G). Los cuerpos celulares de estas estructuras mostraron un marcaje moderado. Además, se observó un marcaje perivascular en la sustancia gris a todos los niveles de los ganglios basales, similar al descrito en las áreas corticales, y astrocitos marcados en la sustancia blanca. Por último, se observó un marcaje en forma de red en las proyecciones estriatoeferentes del globo pálido (Figura 5H) y un marcaje muy intenso en las fibras (Figura 5I) y las neuronas (Figura 5J) de la *substantia nigra pars reticulata*.

En los núcleos talámicos se observó un marcaje neuropílico y neuronal en el núcleo medial. En las áreas hipotalámicas se apreció un marcaje neuronal en los cuerpos mamilares, el núcleo dorsomedial y el área hipotalámica posterior (Figuras 5K,L).

En cerebelo, se observó un marcaje moderado en las capas molecular y granular, así como en las neuronas de Purkinje (Figuras 5M,N). En la capa molecular, se observa un marcaje punteado correspondiente a fibras de terminales nerviosos. El marcaje de las neuronas de Purkinje es perinuclear, con

un marcaje escaso en los axones y las dendritas. Además, se observa marcaje de las interneuronas estrelladas de la capa molecular. Por último, se observó un marcaje muy intenso en los cuerpos celulares y las fibras aferentes que rodean dichos cuerpos en el núcleo dentado (Figura 5N).

En cerebro medio, se apreció un marcaje moderado en las fibras del colículo superior y la sustancia gris periacueductal (PAG) (Figura 5O), en la que se observa un marcaje denso de fibras y un marcaje intenso de las neuronas del núcleo dorsal del rafe y núcleo oculomotor (Figura 5P). Por el contrario, no se apreció marcaje en el núcleo rojo.

En el tallo cerebral, se apreció marcaje neuropílico y neuronal en los núcleos motores hipogloso y vago (Figuras 5Q,R). Además, se encontró marcaje en las fibras de los núcleos olivares inferior, dorsal y medial (Figuras 5S,T).

En la médula espinal, se observó un marcaje intenso en fibras de la sustancia gris y en neuronas del asta motora ventral y zonas intermedias (Figura 5U).

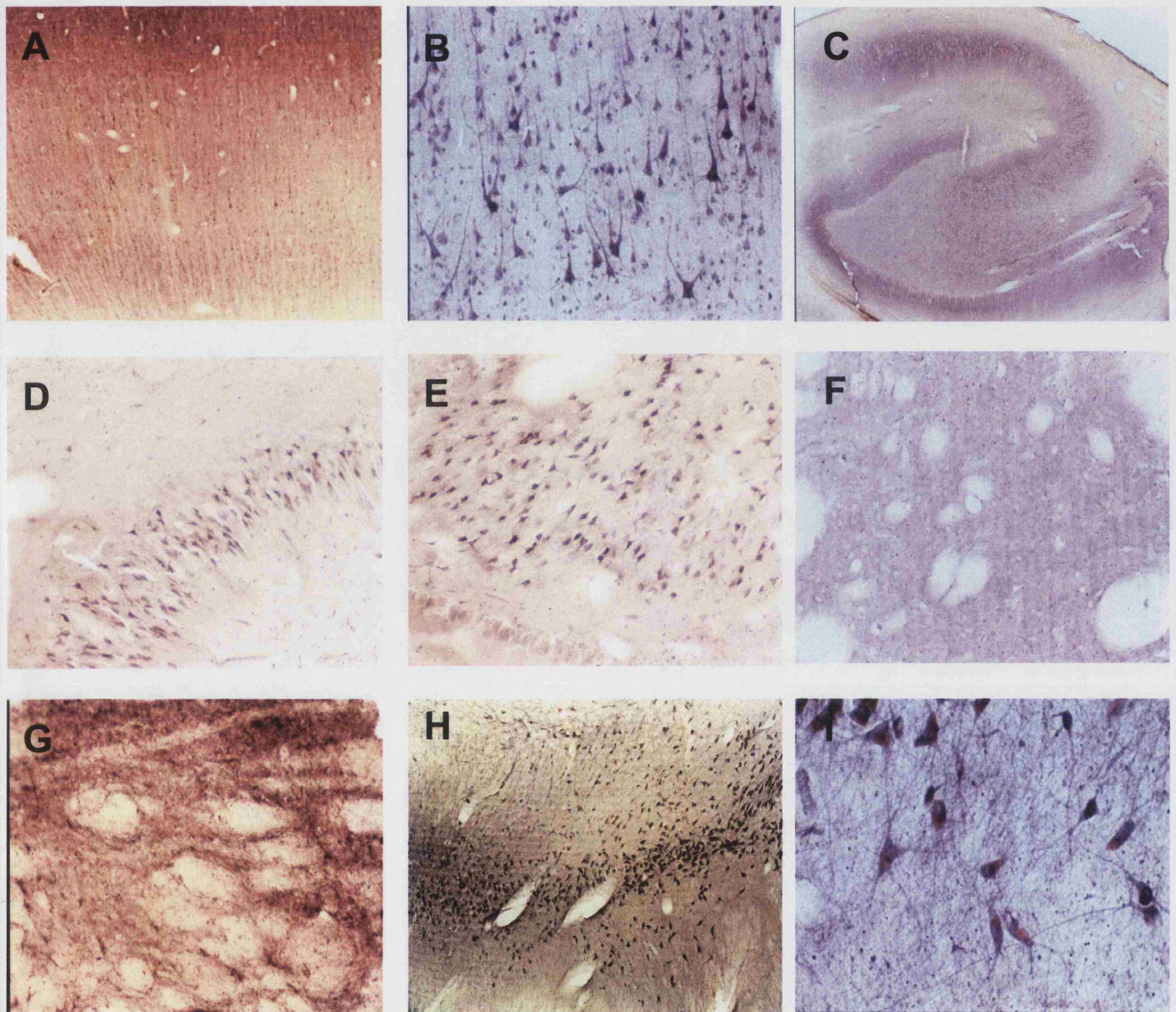


Figura 1.- Distribución de los receptores CB₁ en cerebro humano. (A-B) Células piramidales de la corteza. **(C,D)** Neuronas piramidales de hipocampo. **(E)** Interneuronas del giro dentado del hipocampo. **(F)** Marcaje neuropílico en caudado putamen. **(G)** Globo pálido. **(H-I)** Cuerpos celulares y fibras en *substantia nigra*

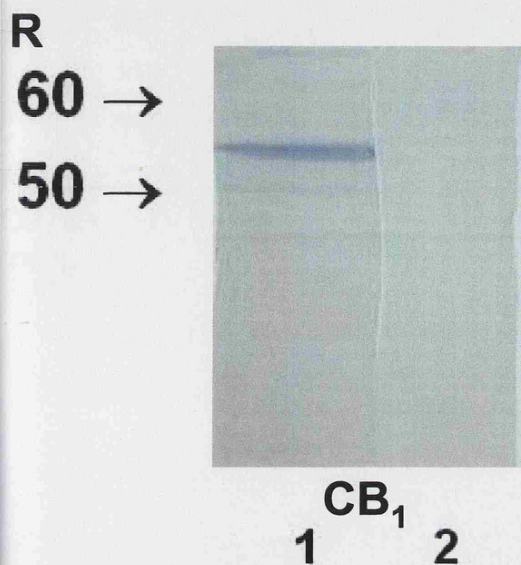
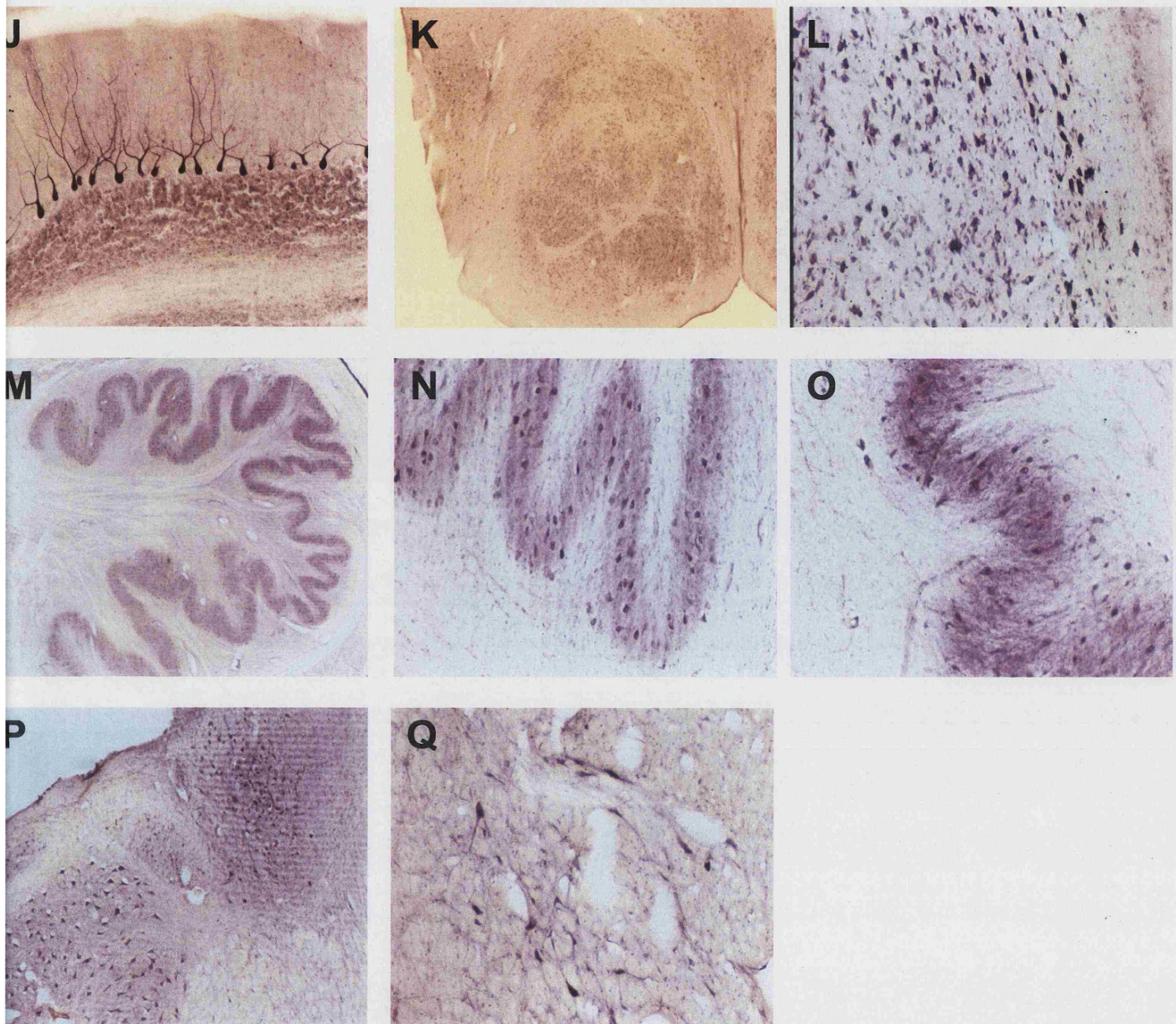


Figura 2.- Distribución de los receptores CB₁ en cerebro humano. (J) Células granulares y células de Purkinje del cerebelo. **(K-L)** Núcleo mamilar del hipotálamo. **(M-N)** Cuerpos celulares y fibras aferentes del núcleo olivar inferior. **(O)** Cuerpos celulares y fibras aferentes del núcleo dentado. **(P)** Núcleo medular. **(Q)** Neuronas motoras del asta anterior de la sustancia gris de la médula espinal cervical. **(R)** **Western blot de receptores CB₁ en homogeneizado de cerebro.** Se obtiene una banda de 50kDa correspondiente a los receptores CB₁ (línea 1). La señal desaparece tras la incubación con el péptido de bloqueo (línea 2).

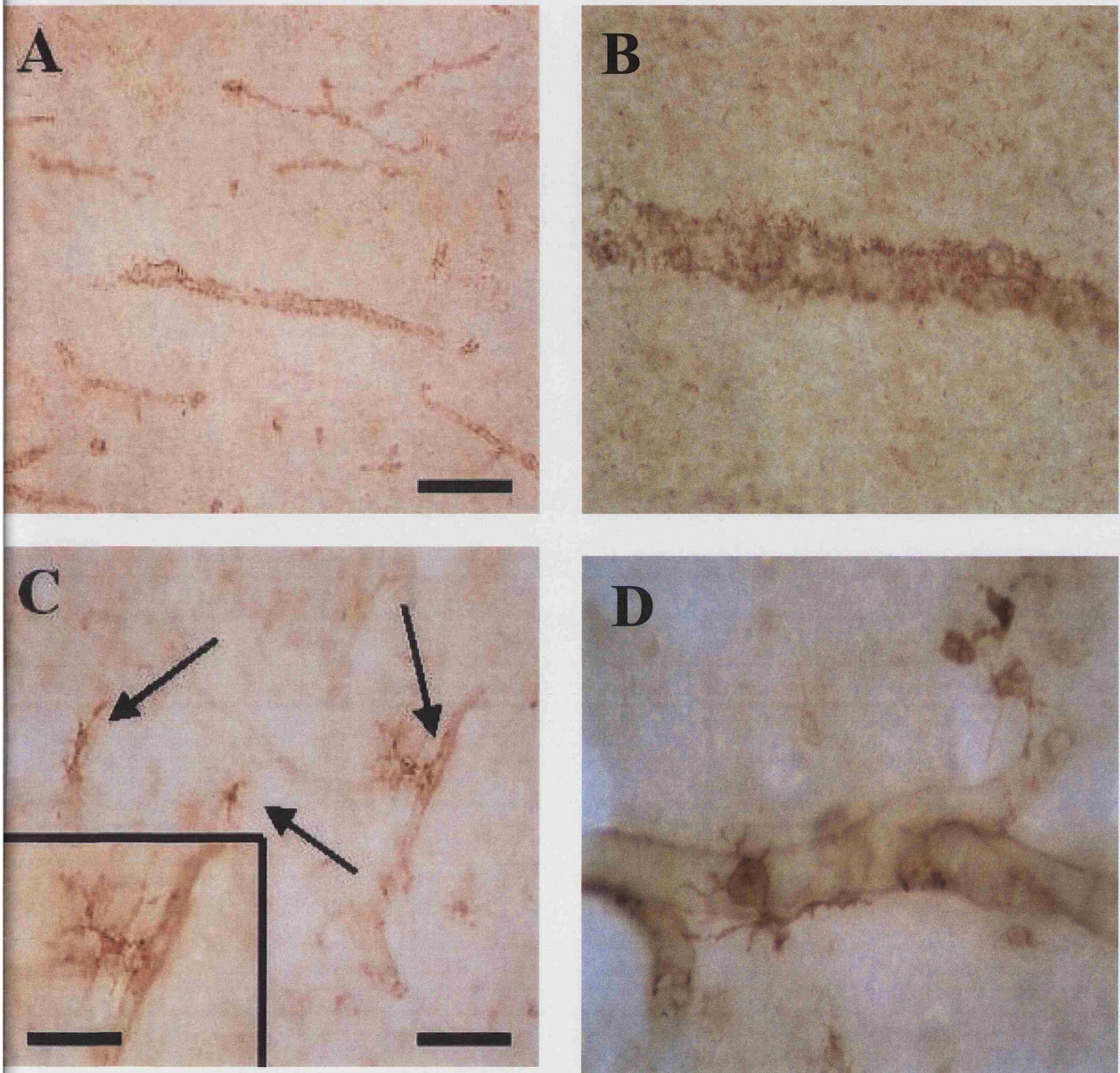


Figura 3.- Expresión de receptores CB₂ en cerebelo humano. (A) Marcaje de receptores CB₂ en vasos sanguíneos. (B) Marcaje punteado de receptores CB₂ en vasos. (C-D) Marcaje de receptores CB₂ en células con morfología de microglia alrededor de los vasos.

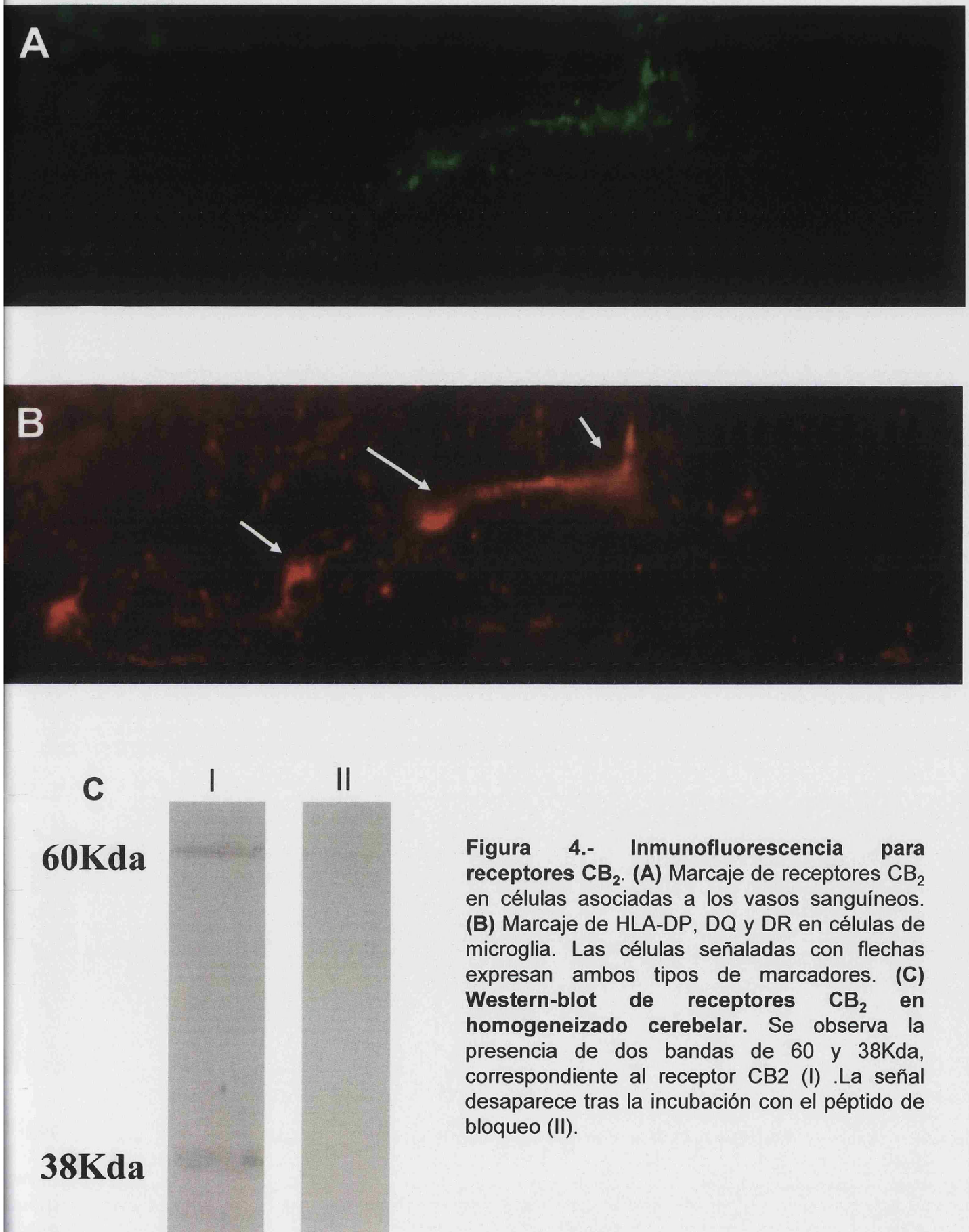


Figura 4.- Inmunofluorescencia para receptores CB₂. (A) Marcaje de receptores CB₂ en células asociadas a los vasos sanguíneos. (B) Marcaje de HLA-DP, DQ y DR en células de microglia. Las células señaladas con flechas expresan ambos tipos de marcadores. (C) **Western-blot de receptores CB₂ en homogeneizado cerebelar.** Se observa la presencia de dos bandas de 60 y 38Kda, correspondiente al receptor CB2 (I). La señal desaparece tras la incubación con el péptido de bloqueo (II).

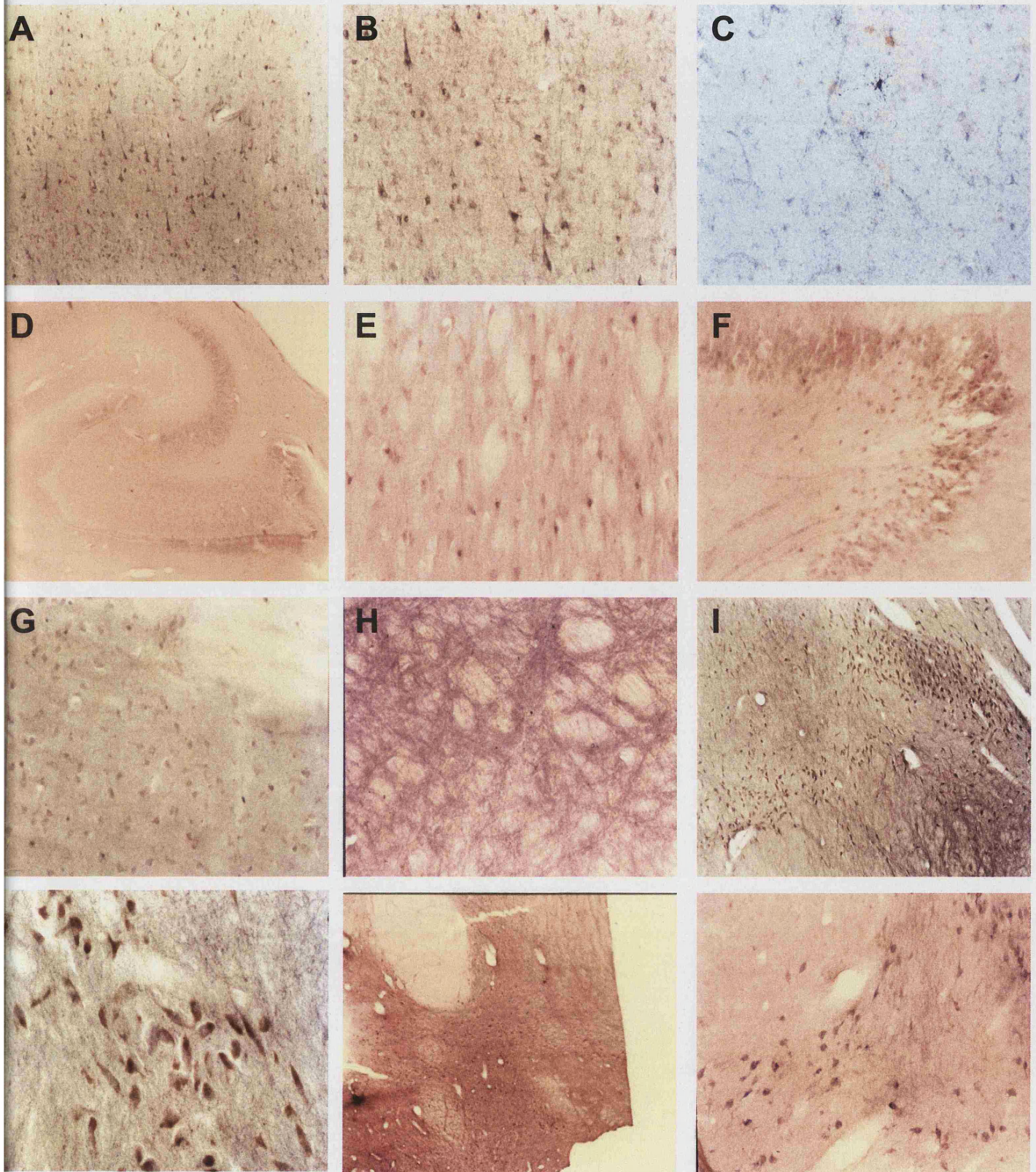


Figura 5.- Distribución de FAAH en cerebro humano. (A-B) Neuronas piramidales de la corteza. **(C)** Astrocitos en la sustancia blanca subcortical. **(D)** Marcaje de FAAH en hipocampo. **(E)** Células piramidales del hipocampo. **(F)** Dendritas marcadas en el giro dentado. **(G)** Marcaje neuropílico y de cuerpos celulares en caudado-putamen. **(H)** Marcaje de fibras en globo pálido. **(I-J)** Marcaje de fibras y cuerpos celulares en *substantia nigra*. **(K-L)** Marcaje en células del área posterior del hipotálamo.

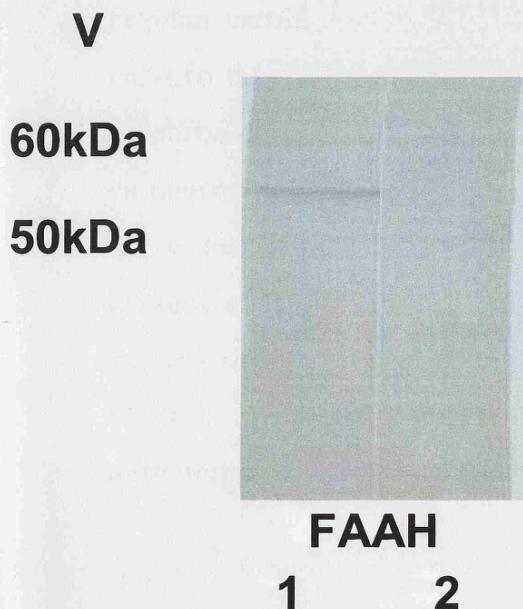
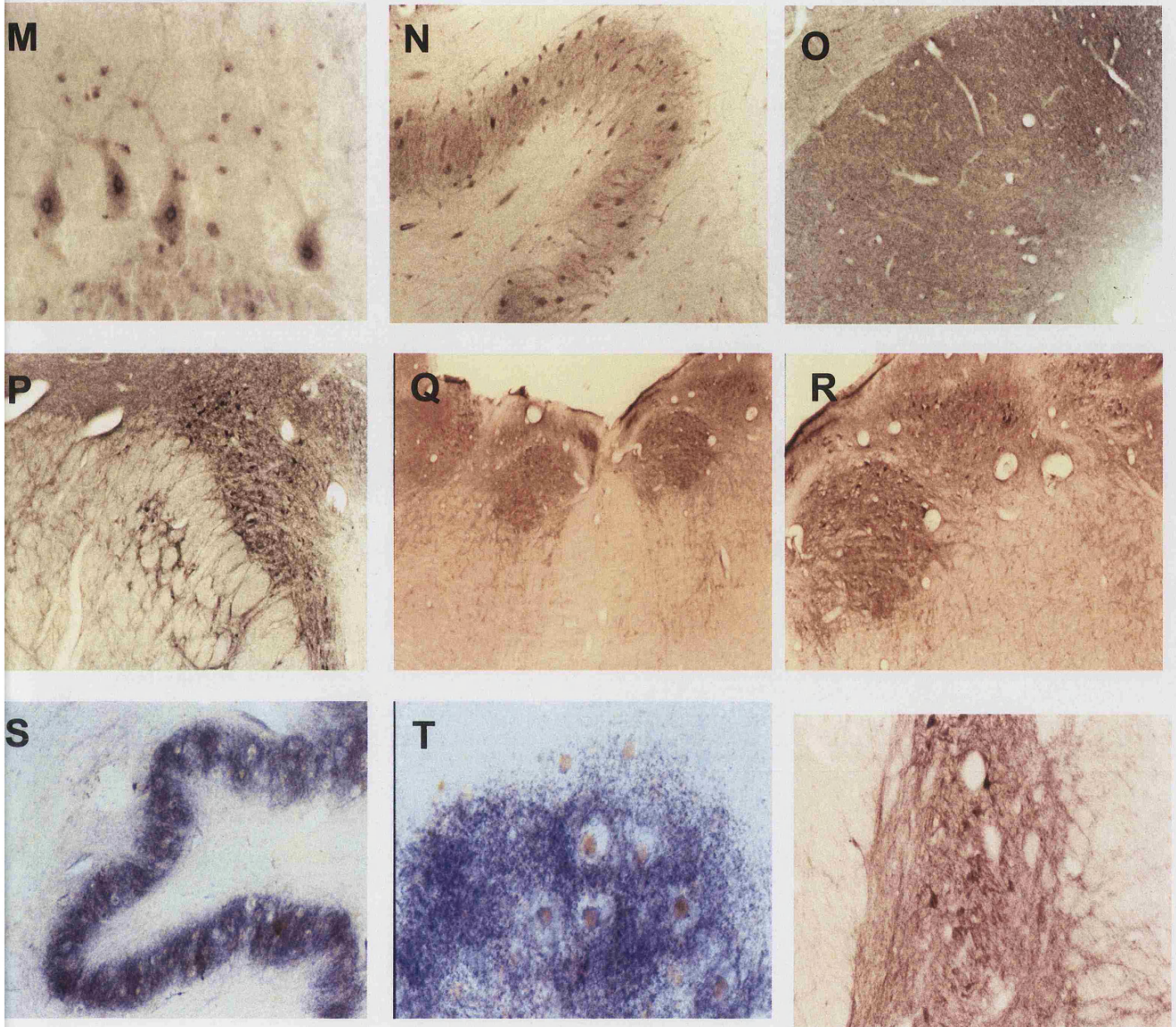


Figura 6.- Distribución de FAAH en cerebro humano. (M) Células granulares y células de Purkinje del cerebelo. (N) Cuerpos celulares y fibras aferentes del núcleo dentado. (O) Marcaje moderado en el colículo superior e intenso en fibras de la PAG. (P) Cuerpos celulares del núcleo oculomotor. (Q-R) Marcaje de fibras en el núcleo medular. (S-T) Fibras del núcleo olivar inferior. (U) Marcaje en sustancia gris de la médula espinal. (V) **Western blot de FAAH en homogeneizado de cerebro.** Se observa una banda de 50kDa correspondiente al enzima (línea 1). No se observa señal tras la incubación con el péptido de bloqueo (línea 2).

2.- LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN EL CEREBRO DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Una vez conocida la distribución de los elementos del SCE en cerebro sano quisimos compararla con la que presentan pacientes con la enfermedad de Alzheimer y comprobar si el cuadro de neuroinflamación asociado a esta enfermedad induce cambios en el patrón de expresión descrito para los distintos elementos del SCE en el cerebro sano. Para ello, utilizamos regiones del cerebro de pacientes con dicha enfermedad en las que se sabe que tienen lugar los cambios moleculares típicos de esta enfermedad. En concreto, utilizamos áreas de hipocampo y corteza parahipocampal. En estas áreas se sabe que hay una gran abundancia de ovillos neurofibrilares, placas neuríticas y tienen lugar procesos neuroinflamatorios. Previamente al marcaje inmunohistoquímico realizamos tinciones que corroboraban el diagnóstico clínico, como el Gallyas (Figuras 7A, B) y la plata metenamina (Figuras 7C, D), confirmando la presencia de placas neuríticas. Además, la intensa neuroinflamación asociada a los depósitos de estos péptidos se confirmó mediante técnicas inmunohistoquímicas con los anticuerpos GFAP y CD68.

2.1.- Receptores CB₁

Desde el punto de vista cualitativo, los estudios inmunohistoquímicos no revelan cambios en la expresión o la distribución de los receptores CB₁ en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer en comparación con los cerebros de pacientes control. La distribución de los receptores en ambos casos es neuronal, con un marcaje especialmente intenso en las neuronas piramidales corticales (Figura 8A). En el cerebro de pacientes con EA no se observa la presencia de receptores CB₁ en la vecindad de las placas neuríticas, que se pueden observar claramente (Figuras 8B,C). La incubación con el péptido de bloqueo previene el marcaje, confirmando de nuevo la especificidad del anticuerpo utilizado (Figura 8D). Aunque apreciamos una menor densidad de

receptores CB₁ en el cerebro de pacientes con la EA, ha de tenerse en cuenta que las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas cualitativas y no cuantitativas, por lo que esta apreciación no pudo corroborarse estadísticamente.

2.2.- Receptores CB₂.

A partir de los estudios inmunohistoquímicos pudimos observar que, a diferencia de los receptores CB₁, la distribución de los receptores CB₂ es distinta en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer en comparación con el de pacientes control. En estos últimos no se observa marcaje significativo para este tipo de receptores (Figura 9A) en las áreas estudiadas, mientras que en los pacientes con EA se observa una evidente expresión de receptores CB₂ en células asociadas a las placas neuríticas (Figuras 9B,C). Las células asociadas a las placas neuríticas y positivas para CB₂ tienen una morfología de células de microglía. Para corroborar que se trata de este tipo de células, se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica con el marcador CD68, marcador fenotípico de células de microglía, en secciones de cerebro de pacientes con EA consecutivas a las utilizadas para CB₂. Se observó que mientras que este marcador lo expresan todas las células de microglía, tanto las asociadas a placas como las no asociadas, las células que expresaban CB₂ son solo las células de microglía asociadas a las placas. (Figura 9D).

La estrecha asociación entre las células de microglía que expresaban los receptores CB₂ y las placas neuríticas se corroboró mediante estudios de doble marcaje para el péptido β -amiloide y los receptores CB₂ en el cerebro de pacientes con la EA. Se observó que los receptores CB₂ se expresan en células con morfología de microglía asociadas a las placas neuríticas ricas en péptido β -amiloide y en microglía que se localizaba en el interior de las placas (Figuras 10A,B).

2.3.- FAAH

Como se ha descrito en el bloque anterior, en el cerebro de pacientes control la enzima FAAH se expresa principalmente en elementos neuronales, mayoritariamente en el cuerpo celular de las neuronas piramidales (Figura 11A). Además de en los elementos neuronales descritos en el apartado anterior, en el cerebro de pacientes con la EA, la FAAH se expresa en células con morfología de astrocitos hipertróficos en la vecindad de las placas seniles en las cortezas entorrinal y parahipocampal (Figuras 11B,C). Para corroborar que se trata de este tipo de células se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos con el anticuerpo GFAP, una proteína del citoesqueleto de astrocitos utilizada como marcador fenotípico de este tipo de células, en secciones de cerebro de pacientes con EA consecutivas a las utilizadas para FAAH. Estos estudios revelaron que las células que expresan FAAH en la vecindad de las placas neuríticas son astrocitos hipertróficos positivos para GFAP (Figura 11D). Esta proteína se expresaba tanto en astrocitos protoplasmáticos como fibrosos, mientras que la FAAH sólo se encuentra en los astrocitos hipertróficos.

La incubación con el péptido de bloqueo previene el marcaje, confirmando la especificidad del anticuerpo utilizado.

Además, se llevaron a cabo estudios de doble marcaje con FAAH y el péptido β -amiloide, y se observó que la FAAH se expresaba en astrocitos hipertróficos que rodean las placas neuríticas ricas en péptido β -amiloide (Figuras 12A,B).

Por último, quisimos estudiar si la FAAH además de estar aumentada a nivel de proteína, también mostraba una mayor actividad en el cerebro de pacientes con la EA con respecto al de pacientes control. Para ello, se diseccionaron placas individuales del cerebro de pacientes con la EA, y áreas de un tamaño similar del cerebro de pacientes control; y se realizó una medida de la actividad del enzima mediante el análisis de la cantidad de AEA hidrolizada. En

este estudio observamos que se producía un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad de la enzima en las placas aisladas de la corteza del cerebro de pacientes con Alzheimer en comparación con muestras de pacientes sanos (Figura 12C).



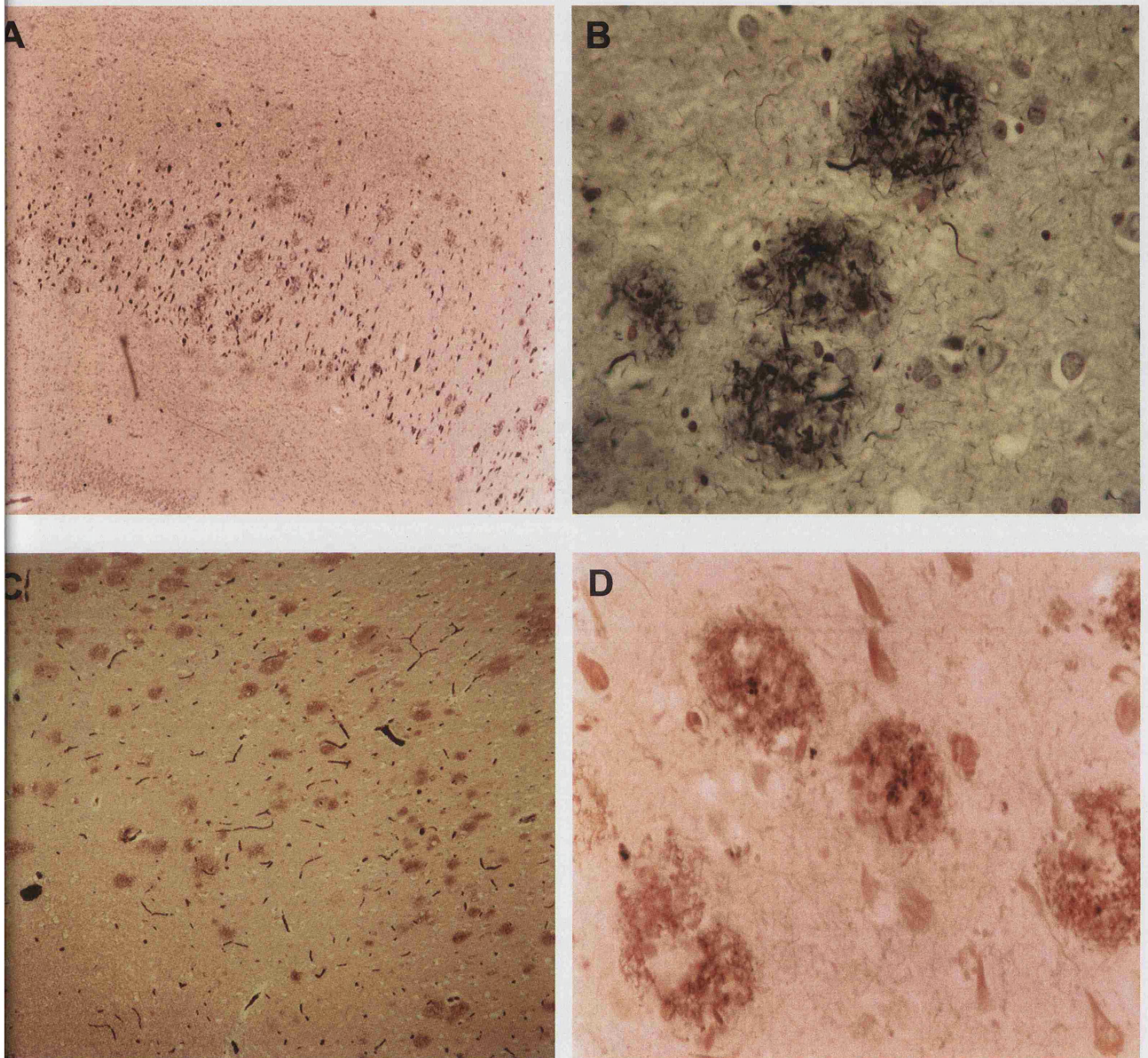


Figura 7.- Tinción de Gallyas (A,B) y plata metenamina (C,D). Se ponen de manifiesto las placas seniles y los ovillos neurofibrilares en cerebros de pacientes con EA.

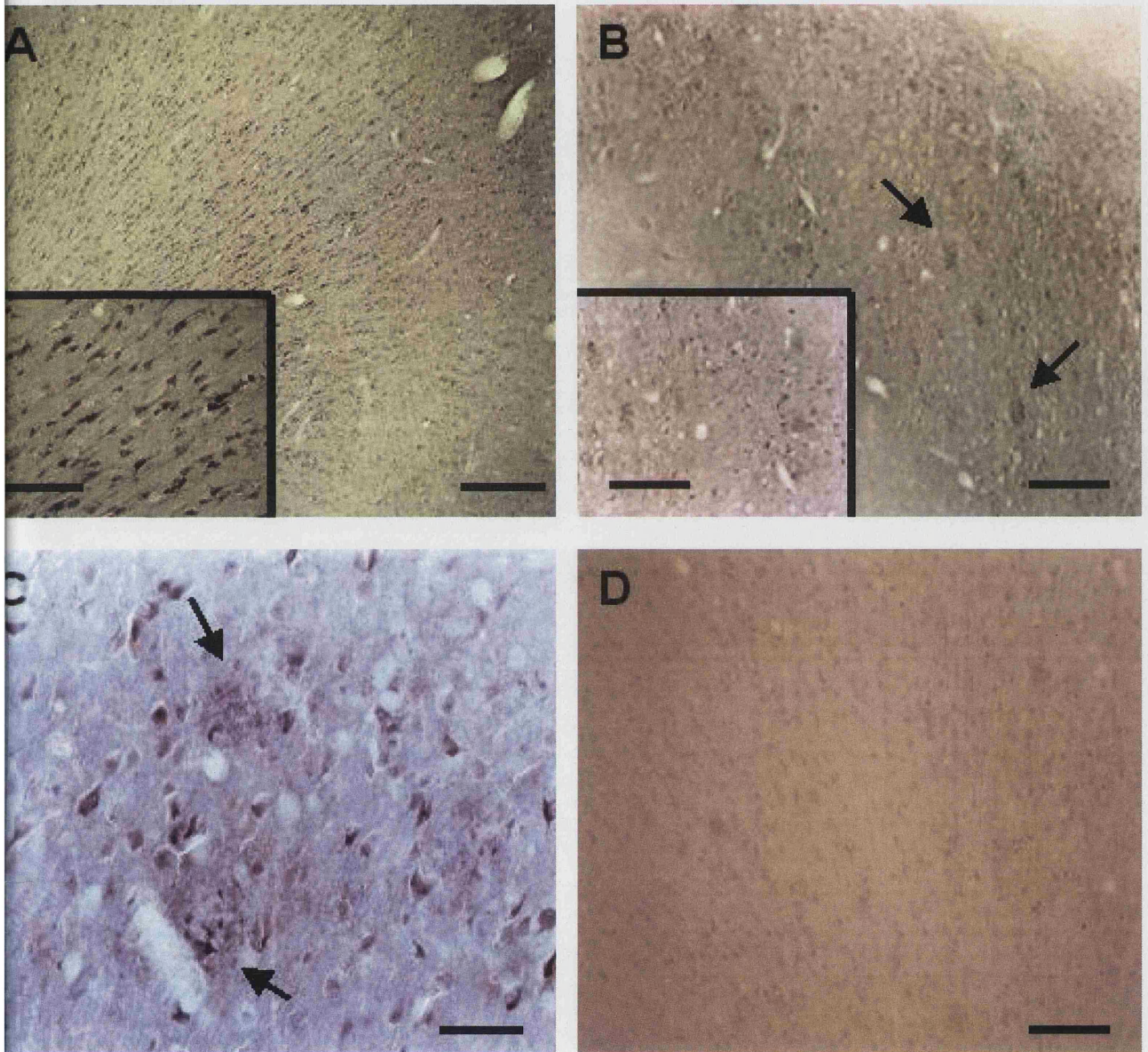


Figura 8.- Marcaje del receptor CB₁ en la corteza parahipocampal. (A) Marcaje en un paciente control. A mayor aumento se observa marcaje intenso en las neuronas piramidales. **(B)** Marcaje en un paciente con la enfermedad de Alzheimer. No se observa marcaje en la vecindad de las placas, que se pueden observar claramente (señaladas por flechas). **(C)** Marcaje en detalle en un paciente con la EA. No se observa marcaje en la vecindad de las placas. **(D)** No se observa marcaje tras la incubación con el péptido de bloqueo.

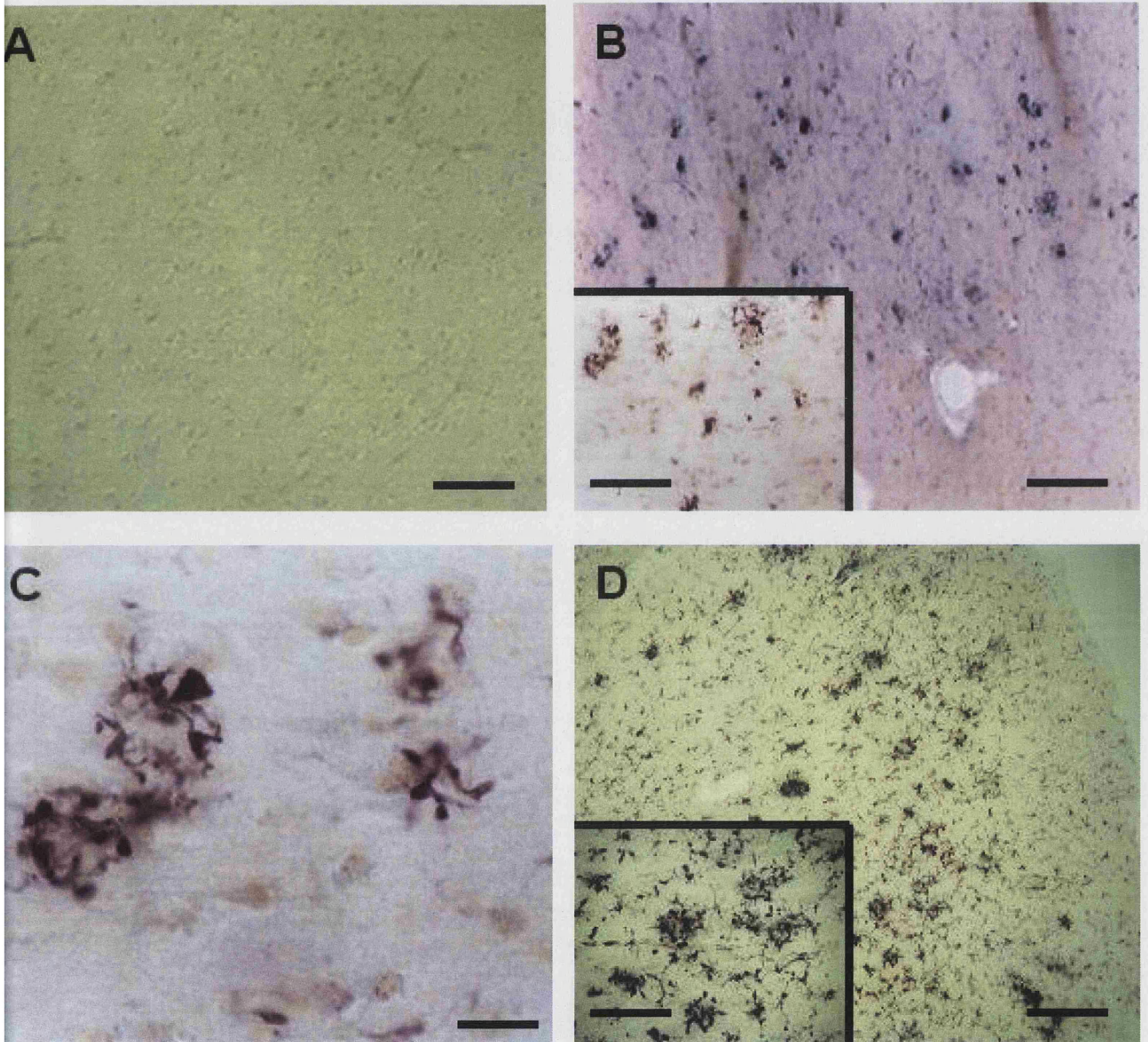


Figura 9.- Marcaje de CB₂ (A-C) y CD68 (D) en la corteza parahipocampal. (A) Marcaje en un paciente control. No se observa ningún tipo de marcaje. **(B)** Marcaje en un paciente con la EA. Se observa un marcaje intenso en células con morfología de microglia asociadas a las placas neuríticas. **(C)** Marcaje detallado de células con morfología de microglia positivas para CB₂. **(D)** Marcaje de CD68 en un paciente con la EA. La morfología de las células positivas para CB₂ coincide con la de las células de microglá positivas para CD68.

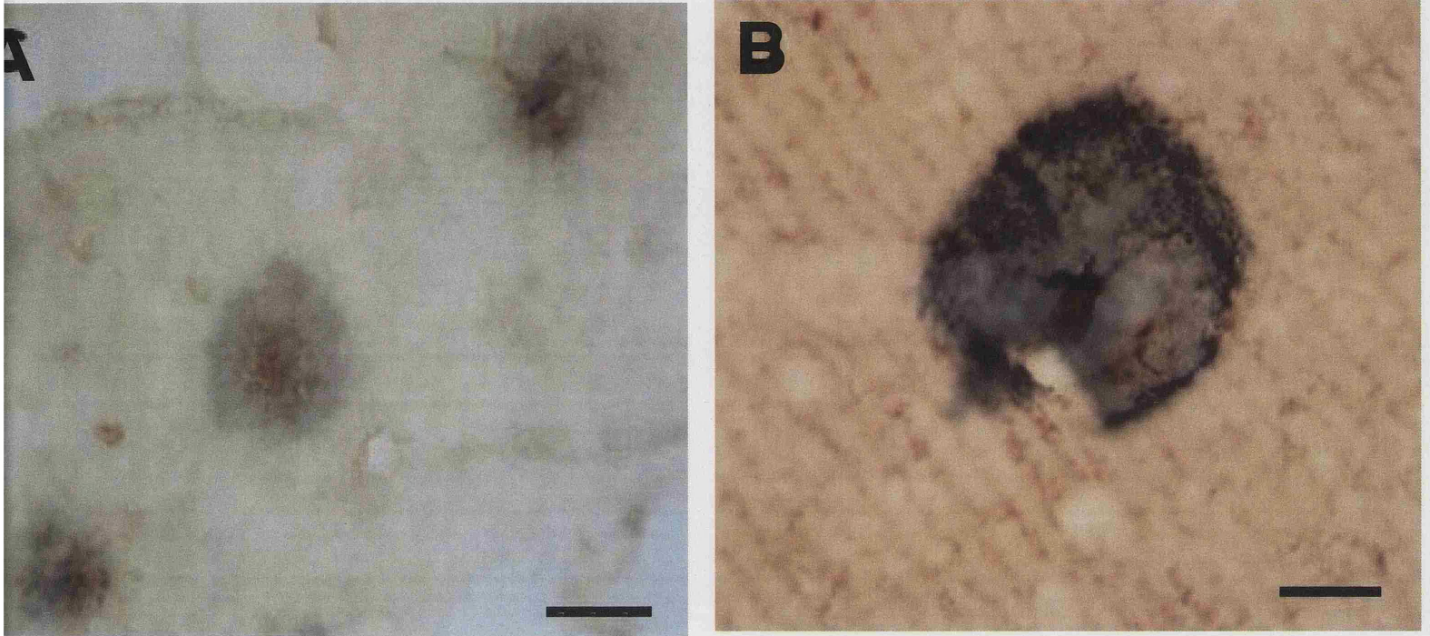


Figura 10.- CB_2 se expresa en las células de microglia que rodean las placas neuríticas en el cerebro de pacientes con EA. (A) Doble marcaje del péptido β -amiloide (azul) y los receptores CB_2 (marrón). Se observa la expresión de receptores CB_2 en células con morfología de microglía asociadas a las placas neuríticas. (B) Detalle de una placa de β -amiloide (azul) con células de microglía positivas para CB_2 (marrón) en su interior.

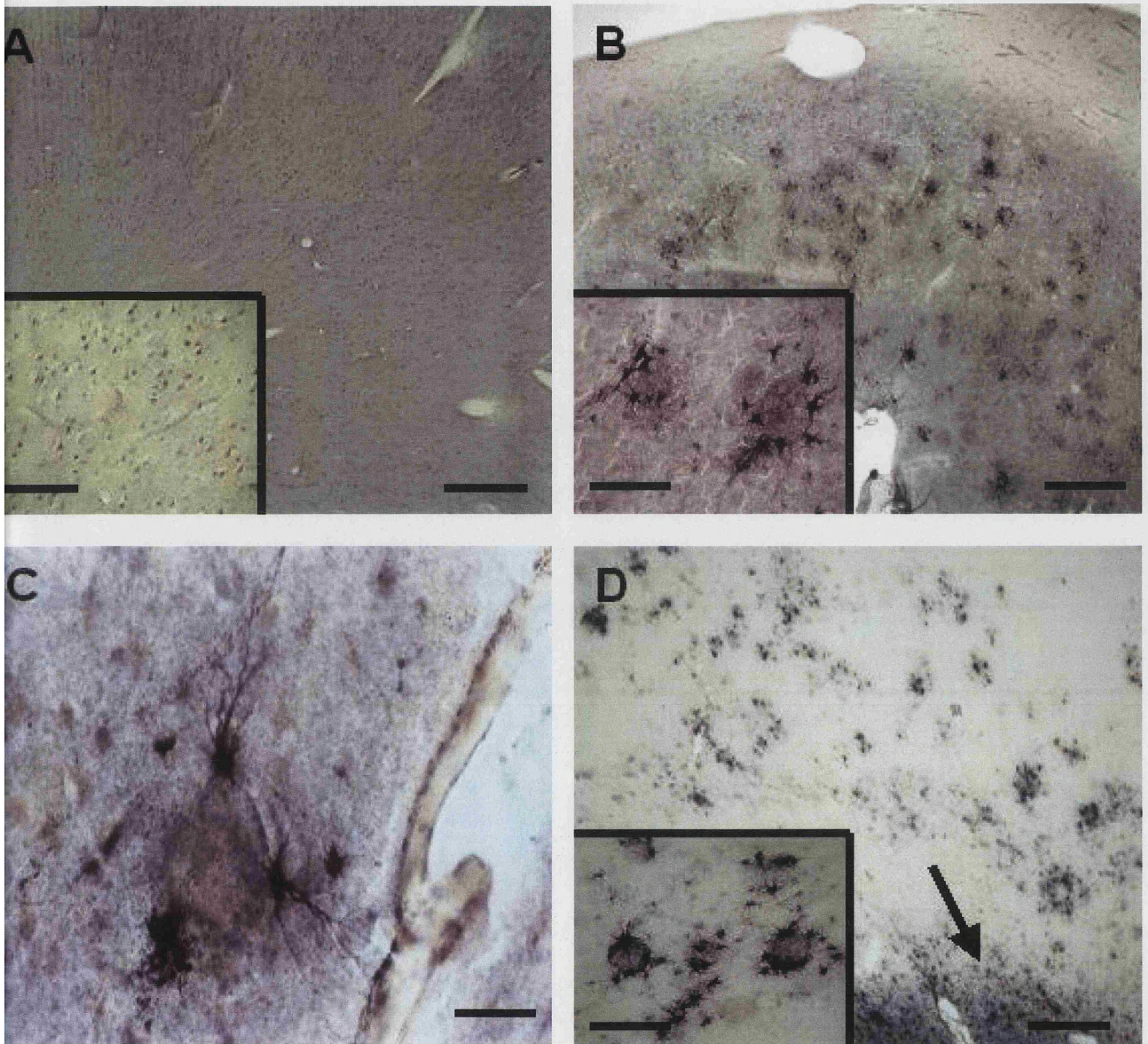


Figura 11.- Marcaje inmunohistoquímico de FAAH (A-C) y GFAP (D). (A) Marcaje en un paciente control. Se observa un patrón de marcaje neuronal. (B) Marcaje en un paciente con EA. Se observa un intenso marcaje en los astrocitos hipertróficos asociados a las placas neuríticas. (C) Marcaje en detalle de los asrocitos hipertróficos. (D) Marcaje en un paciente con EA. Se observa marcaje de GFAP tanto en astrocitos protoplasmáticos como fibrosos.

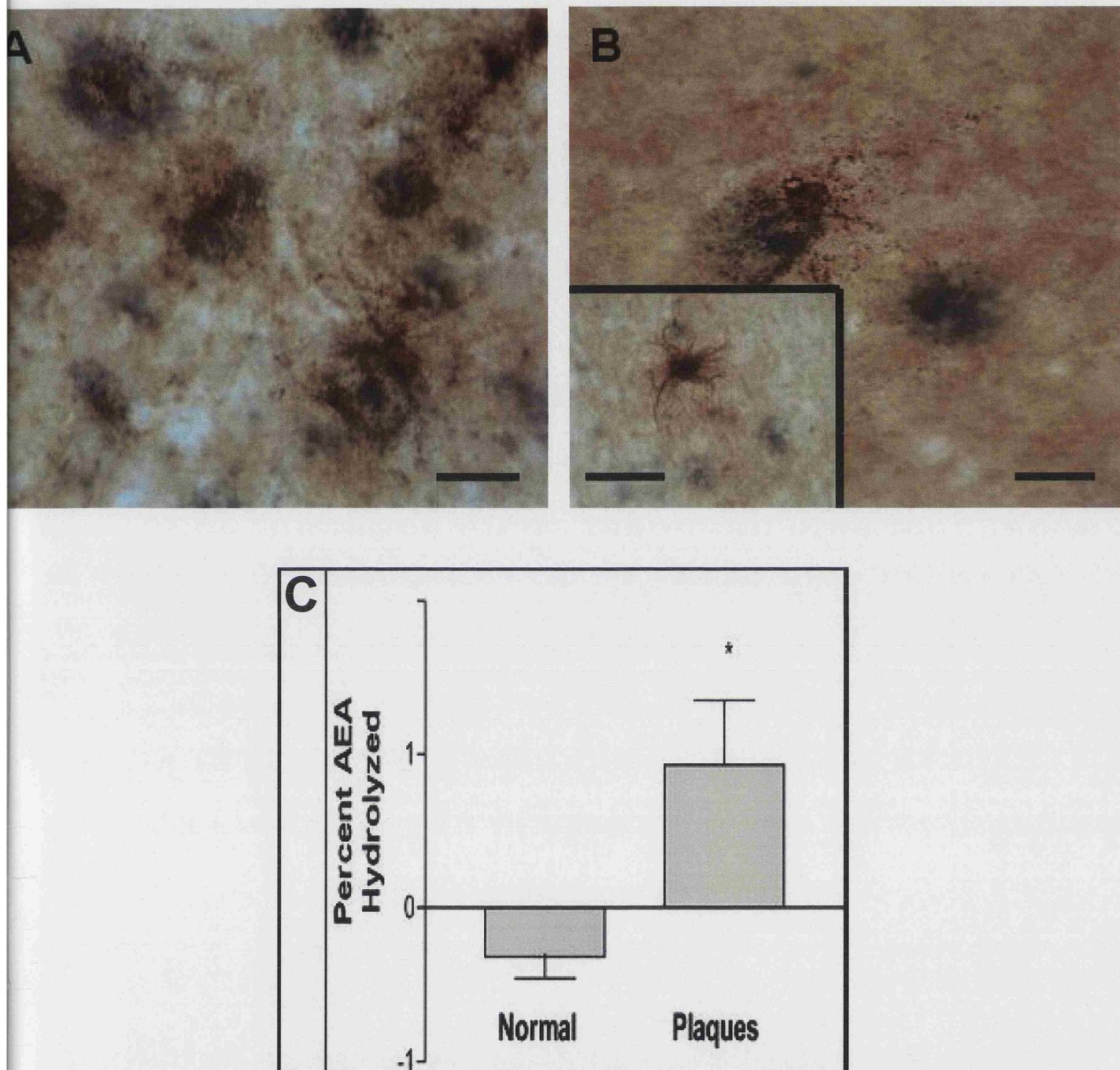


Figura 12.- Doble marcaje FAAH/ β -amiloide (A,B) y actividad de la FAAH (C). (A-B) Marcaje de FAAH en astrocitos hipertróficos (marrón) alrededor de las placas neuríticas (azul). **(C)** Se muestran las medias de las cinco determinaciones individuales. Los dos grupos comparados son significativamente distintos ($p < 0.05$).

3.- LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO DE ALZHEIMER, EL 3xTg-AD

El modelo de ratones transgénicos 3xTg-AD se considera un buen modelo para el estudio de la patología de la EA. Estos ratones desarrollan una neuropatología progresiva y dependiente de la edad que incluye tanto la formación de placas seniles como la de ovillos neurofibrilares (Oddo y cols., 2003). Al igual que ocurre en humanos, los depósitos de β -amiloide aparecen en primer lugar en regiones corticales y posteriormente con la edad se extienden a otras regiones como el hipocampo. Por el contrario, los agregados de proteína Tau aparecen primero en el hipocampo y con la edad se extienden a la corteza (Oddo y cols., 2003). Además, las placas seniles se forman en edades más tempranas que los ovillos, datos que son consistentes con la hipótesis de la cascada amiloide. Por último, estos animales también presentan alteraciones de la plasticidad sináptica (Oddo y cols., 2003). La aparición de estas características patológicas sigue un curso temporal de varios meses, siendo evidentes a partir de los 9 meses. Por todas estas razones, este modelo de ratón es adecuado para el estudio de los posibles cambios en la expresión de los distintos elementos del SCE. Para ello, llevamos a cabo experimentos inmunohistoquímicos y RT-PCR para medir los niveles de ARNm.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas corroboramos que los ratones de edad avanzada (24 meses) presentaban depósitos del péptido β -amiloide tanto extracelulares como intraneuronales en la corteza (Figura 13A) y una abundante gliosis, con células de microglía activada (Figura 13B) y astrocitos hipertróficos (Figura 13C), de acuerdo con lo descrito previamente para este modelo. Además, observamos la presencia de abundantes depósitos de β -amiloide extra e intraneuronales en otras regiones cerebrales y de forma destacada en la amígdala (Figuras 13D,E).

Las técnicas inmunohistoquímicas no revelaron ningún cambio en los niveles de expresión y la distribución de los receptores CB₁ y CB₂ y el enzima FAAH en los animales transgénicos con respecto a los animales control a ninguna de las edades estudiadas (2, 6, 12 y 15 meses). Asimismo, mediante RT-PCR, se determinaron los niveles de ARNm de los receptores CB₂ y FAAH en muestras de cerebros de ratones 3xTg-AD de 15 meses de edad y de ratones control de la misma cepa y edad. No se observaron cambios en los niveles de ARNm de los receptores CB₂ ni en la corteza ni en el hipocampo ($p=0.23$ y $p=0.55$, respectivamente), regiones estudiadas por ser las que presentan un mayor número de depósitos de β -amiloide. Igualmente, no se observaron cambios en los niveles del ARNm de FAAH en corteza ($p=0.43$). Sin embargo, se observó una ligera disminución de los niveles de ARNm de FAAH en el hipocampo de los animales transgénicos con respecto a los animales control, aunque esta diferencia no resultó significativa ($p=0.07$) (Figuras 14A-D).

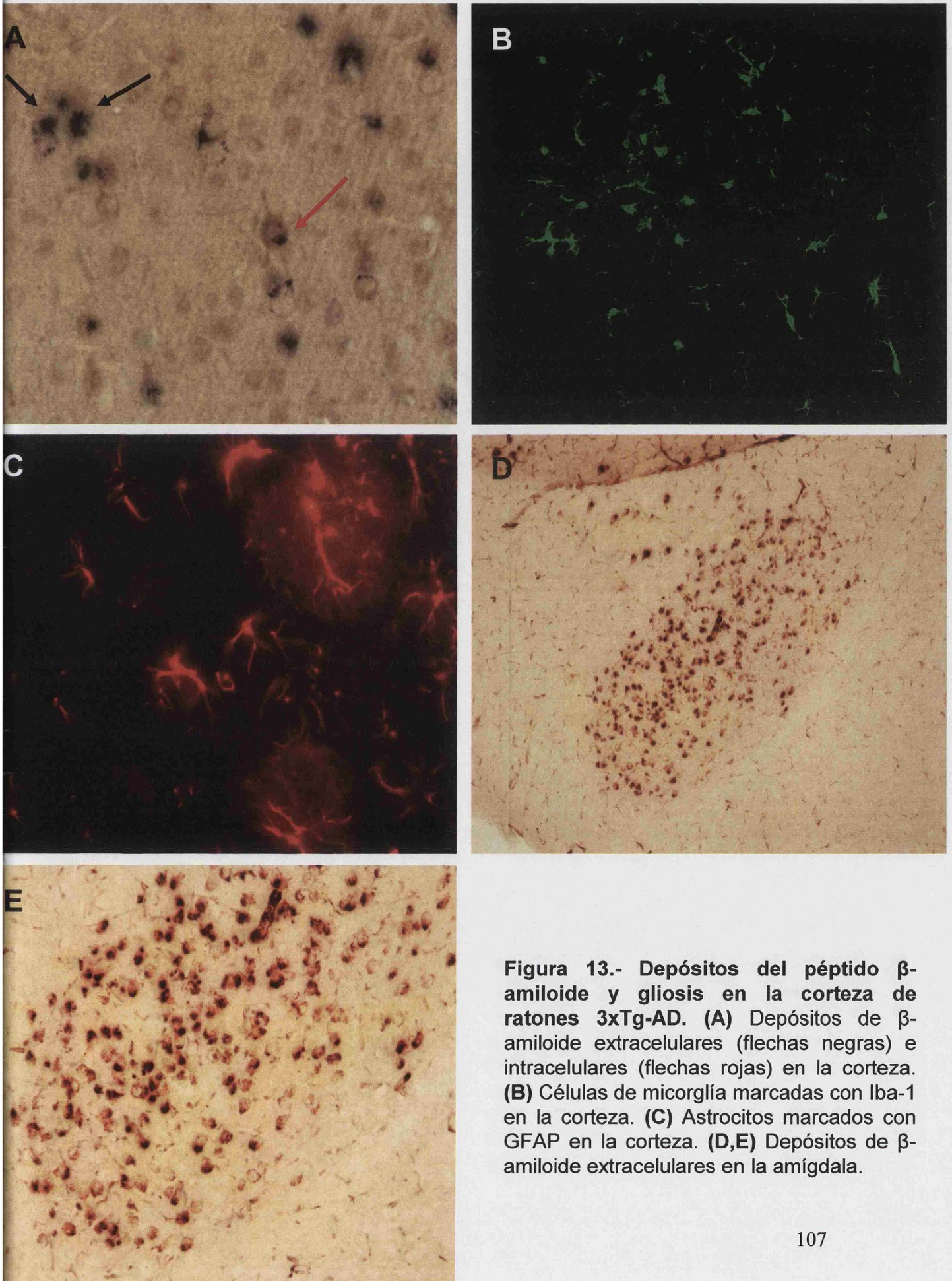


Figura 13.- Depósitos del péptido β -amiloide y gliosis en la corteza de ratones 3xTg-AD. (A) Depósitos de β -amiloide extracelulares (flechas negras) e intracelulares (flecha roja) en la corteza. **(B)** Células de micorglía marcadas con Iba-1 en la corteza. **(C)** Astrocitos marcados con GFAP en la corteza. **(D,E)** Depósitos de β -amiloide extracelulares en la amígdala.

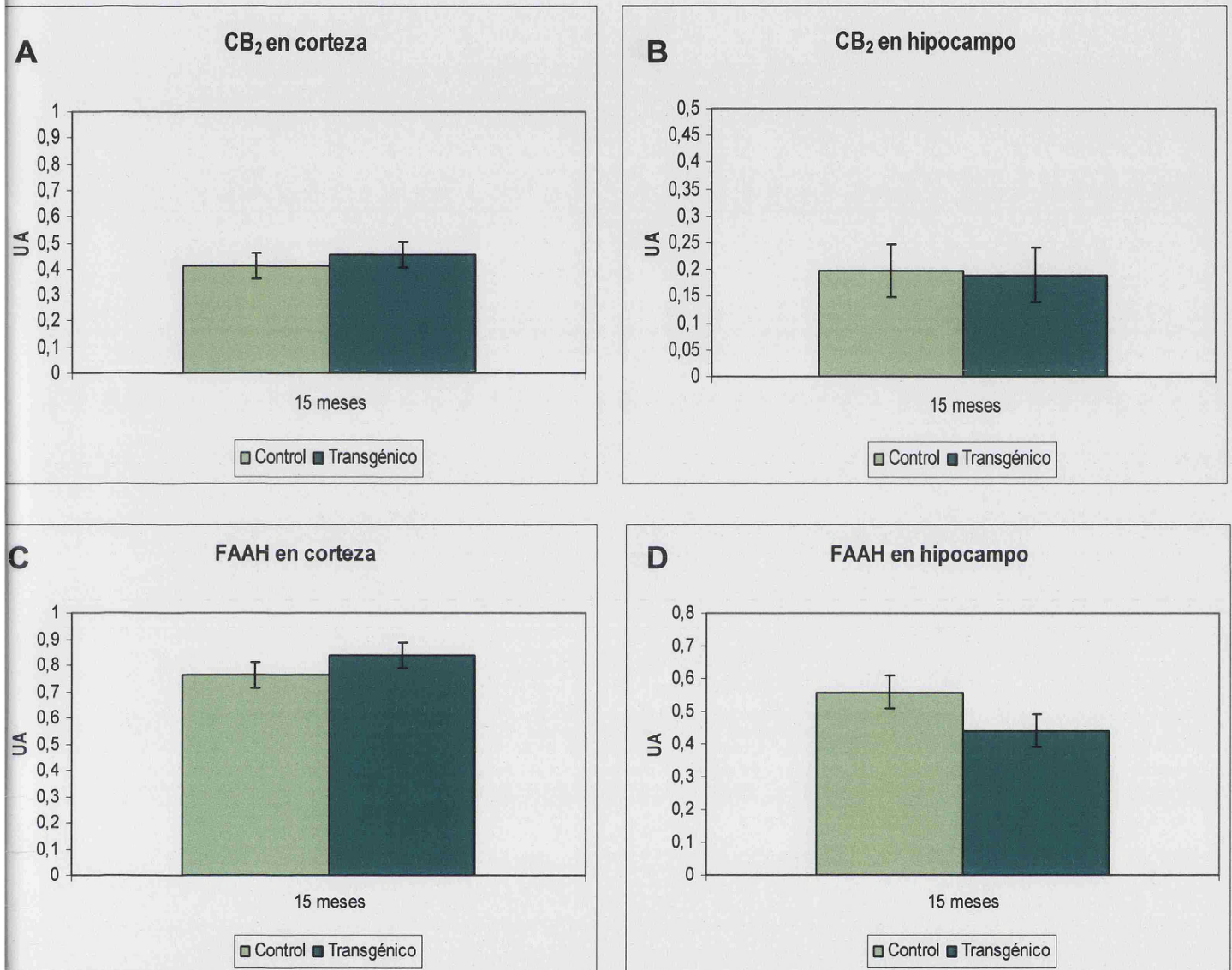


Figura 14.- Niveles de ARNm de CB₂ y FAAH en ratones 3xTg-AD y ratones control de 15 meses a nivel de corteza e hipocampo. (A-B) Niveles de ARNm de receptores CB₂ en corteza e hipocampo, respectivamente. No se observaron cambios en los niveles de ARNm del receptor CB₂ ni en corteza ni en hipocampo ($p=0.23$ y $p=0.55$, respectivamente). (C-D) Niveles de ARNm de FAAH en corteza e hipocampo, respectivamente. No se observaron cambios en los niveles de expresión de FAAH en corteza ($p=0.43$). Se observa una tendencia a la disminución de los niveles de ARNm de FAAH en hipocampo en ratones transgénicos con respecto a animales control, aunque este cambio no es estadísticamente significativo ($p=0.07$).

4.- LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN EL SÍNDROME DE DOWN

El Síndrome de Down es una trisomía del cromosoma 21, que incluye numerosos genes entre los que se encuentran el de la APP. La mayoría de las personas con esta enfermedad desarrollan con el tiempo una patología similar a la de la enfermedad de Alzheimer con placas seniles y ovillos neurofibrilares. Este hecho hace que el SD sea considerado un buen modelo para el estudio de la progresión de la EA. Por ello, realizamos estudios inmunohistoquímicos en muestras de cerebro de pacientes con SD a diferentes edades con el fin de conocer el momento de la patología en el que se produce la expresión de los distintos elementos del SCE. Como controles se utilizaron muestras de cerebro de pacientes sanos con diferentes edades.

Los estudios inmunohistoquímicos mostraron que de los siete pacientes con SD, sólo tres de ellos revelan la presencia de placas. Como se esperaba, estos tres casos corresponden a los individuos de edad adulta (34, 48 y 51 años). Además, se observó que el número de depósitos del péptido β -amiloide aumenta con la edad, siendo máximo en la corteza del paciente con 51 años, en el cual la gran mayoría de la sustancia gris estaba ocupada por estas estructuras (Figuras 15A-C).

4.1.- Receptores CB₁

La distribución o el nivel de expresión de los receptores CB₁ en los pacientes con Síndrome de Down no presentaba cambios con respecto a los pacientes control, con la excepción del caso de 51 años, en el que se observó una menor expresión de este tipo de receptores, probablemente debida a la pérdida neuronal masiva que tiene lugar a consecuencia de la enfermedad. La distribución de este tipo de receptores se localiza en las neuronas piramidales de la capa IV y en las neuronas de la capa VI de la corteza en ambos casos (Figura 15D).

4.2.- Receptores CB.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la enfermedad de Alzheimer, se observan cambios en la distribución y la expresión de los receptores CB₂ en los pacientes con Síndrome de Down , mediante técnicas inmunohistoquímicas.

No se observó marcaje para los receptores CB₂ en la corteza del cerebro de pacientes control ni en la de los pacientes jóvenes con SD, con la excepción de un ligero marcaje en células perivasculares de la sustancia blanca. Por el contrario, se observa una mayor expresión de este tipo de receptores en células que rodean las placas ricas en péptido β -amiloide en las secciones de tejido de los pacientes de edad adulta con SD (34, 48 y 51 años) (Figuras 16A,B). Para confirmar qué tipo de células expresaban receptores CB₂ se llevaron a cabo estudios de doble marcaje y se observó que las células positivas para el receptor CB₂, son también positivas para el marcador HLA-DR, un marcador fenotípico característico de las células de microglia (Figuras 16C-E).

4.3.- FAAH

La distribución de FAAH en la corteza coincidía con la descrita previamente, con un marcaje neuronal, como ponen de manifiesto los estudios inmunohistoquímicos. La mayor intensidad de marcaje en los casos control y los pacientes jóvenes con SD se localiza en las neuronas de mayor tamaño de la corteza, mientras que las neuronas de tamaño medio y pequeño muestran una menor intensidad de marcaje. En los pacientes con SD de edad adulta se observó una mayor expresión de FAAH en células asociadas a los depósitos de β -amiloide (Figura 17A,B). Para confirmar qué tipo de población celular expresaba FAAH, se realizaron estudios de doble marcaje, observando que las células que expresaban dicho enzima eran positivas también para GFAP, marcador característico de astrocitos (Figuras 17C-E).

Para estudiar más a fondo la relación entre la aparición de las placas neuríticas y la inducción de la expresión de los receptores CB₂ y FAAH en las células gliales se llevó a cabo un estudio semicuantitativo a partir de los datos inmunohistoquímicos obtenidos. Este análisis consiste en determinar el número de placas y el de células positivas para CB₂ y FAAH asociadas a dichas placas en las secciones de tejido utilizadas. Los resultados mostraron que el número de placas aumenta en las secciones de pacientes adultos con SD en comparación con las secciones de los casos control y los pacientes jóvenes con SD, en los cuales no se observaron placas. El número de células positivas para CB₂ y para FAAH aumenta de forma paralela al número de placas, siendo máximo en el paciente con SD de 51 años (Tabla 1).

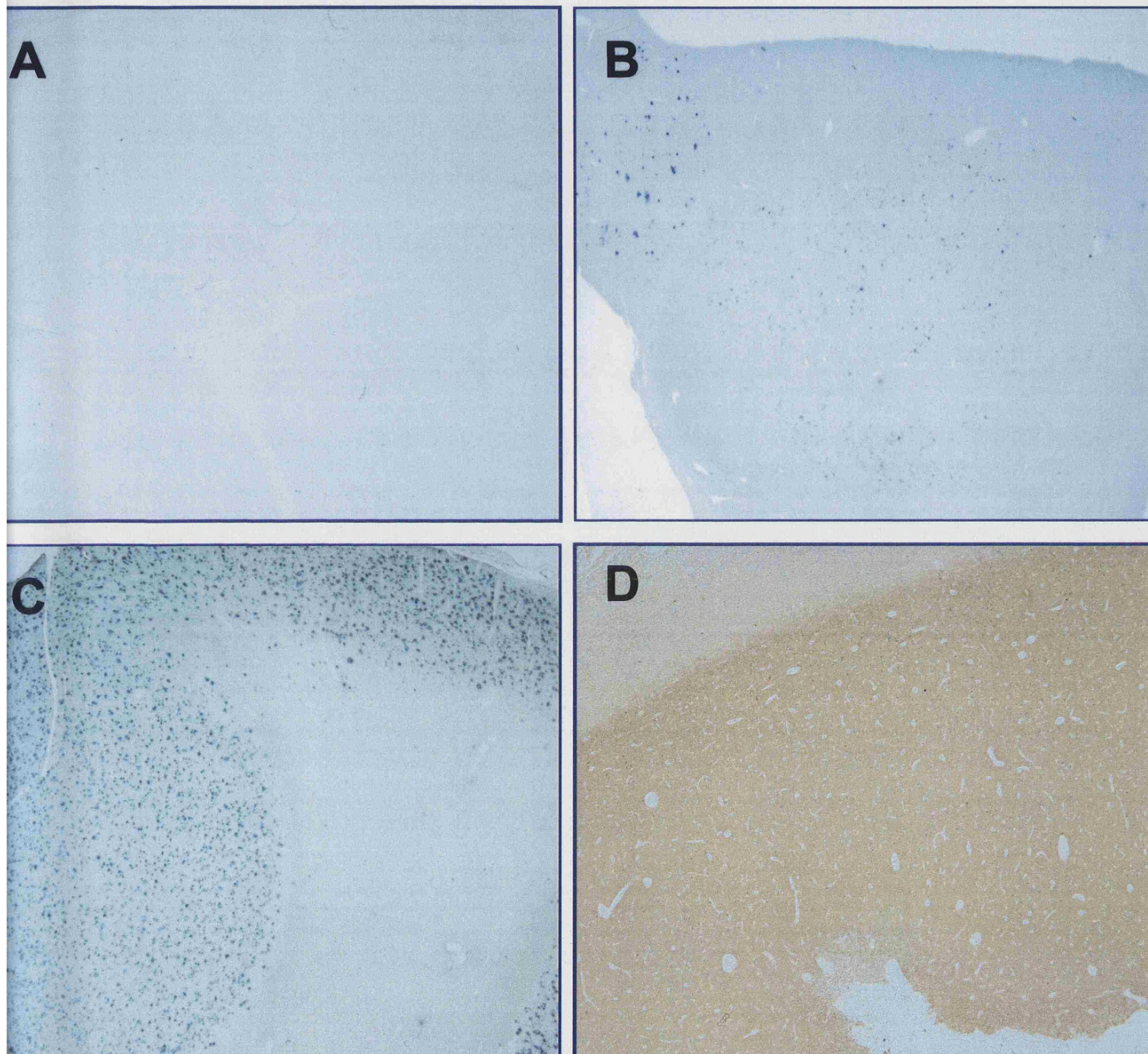


Figura 15.- Marcaje del péptido β -amiloide en pacientes con el Síndrome de Down (A_C). Se observa un expresión dependiente de la edad. **(A)** 9 años. **(B)** 34 años. **(C)** 51 años. **(D) Marcaje del receptor CB_1 en la corteza de un paciente con Síndrome de Down.** No se observan cambios en su expresión o distribución con respecto a los pacientes control. Se observa un marcaje neuronal.

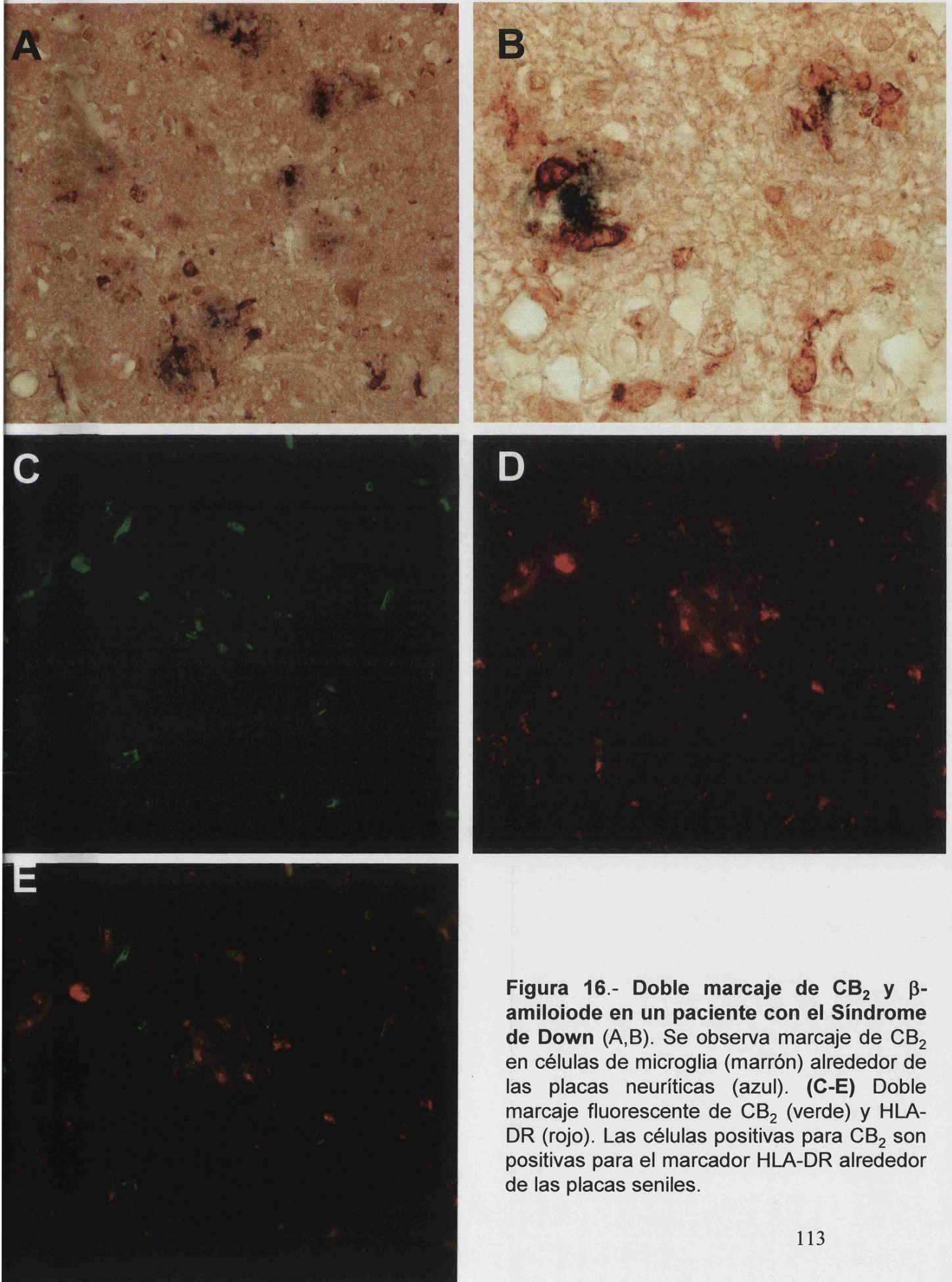


Figura 16.- Doble marcaje de CB₂ y β -amiloide en un paciente con el Síndrome de Down (A,B). Se observa marcaje de CB₂ en células de microglia (marrón) alrededor de las placas neuríticas (azul). (C-E) Doble marcaje fluorescente de CB₂ (verde) y HLA-DR (rojo). Las células positivas para CB₂ son positivas para el marcador HLA-DR alrededor de las placas seniles.

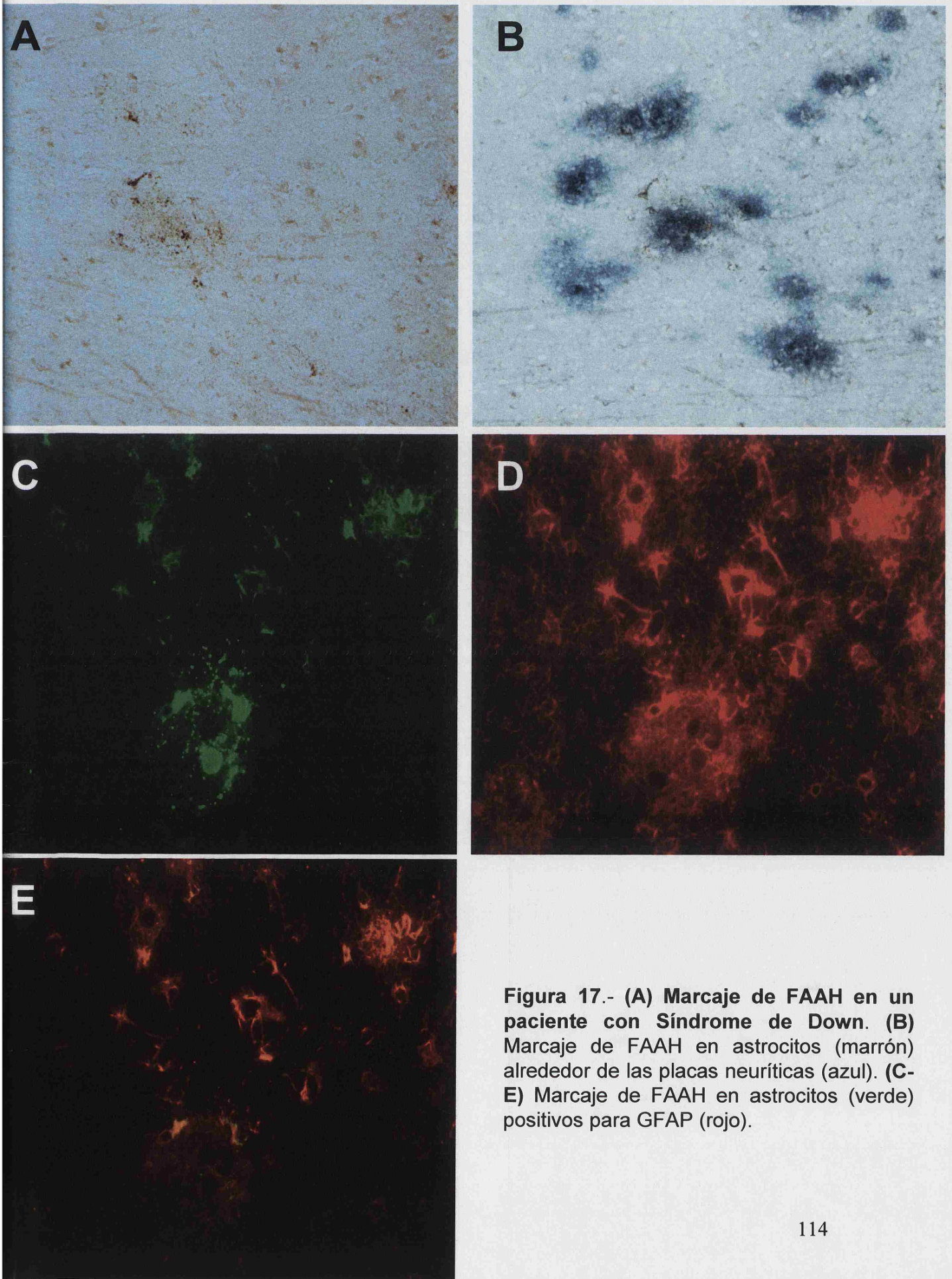


Figura 17.- (A) Marcaje de FAAH en un paciente con Síndrome de Down. (B) Marcaje de FAAH en astrocitos (marrón) alrededor de las placas neuríticas (azul). (C-E) Marcaje de FAAH en astrocitos (verde) positivos para GFAP (rojo).

ASE	<u>DIAGNOSIS</u>	<u>AGE</u>	<u>NUMBER OF Aβ</u> <u>PLAQUES/cm² OF</u> <u>TISSUE</u>	<u>NUMBER OF CB₂+</u> <u>MICROGLIA/TISSUE</u> <u>SECTION</u>	<u>NUMBER OF FAAH+</u> <u>ASTROCYTES/TISSUE</u> <u>SECTION</u>
C90-47	DOWN SYNDROME	6 DAYS	N.D.	N.D.	N.D.
N79-8	DOWN SYNDROME	8 MONTHS	N.D.	N.D.	N.D.
N82-48	DOWN SYNDROME	8 YEARS	N.D.	N.D.	N.D.
N79-24	DOWN SYNDROME	9 YEARS	N.D.	N.D.	N.D.
A87-39	DOWN SYNDROME	34 YEARS	*	+	+
A04-50	DOWN SYNDROME	48 YEARS	**	++	+
TB1864	DOWN SYNDROME	51 YEARS	***	++++	+++
C94-38	CONTROL	30 WEEKS GESTATION	N.D.	N.D.	N.D.
A95-75	CONTROL	29 YEARS	N.D.	N.D.	N.D.
A96-6	CONTROL	58 YEARS	N.D.	N.D.	N.D.

* < 10; ** 10-20; *** > 20 plaques/cm² of tissue
+ < 10; ++ 100-200; +++ 200-500; ++++ > 500 cells/section

Tabla 1.- Estudio semicuantitativo del número de células asociadas a placas que expresan los receptores CB₂ y FAAH en el cerebro de pacientes con SD en comparación con el cerebro de pacientes control. Se observa un aumento del número de células positivas para CB₂ y FAAH en el cerebro de individuos adultos con SD, mientras que no se observan células positivas para CB₂ y FAAH en el cerebro individuos jóvenes con SD o individuos control. El número de células positivas para CB₂ y FAAH aumenta en paralelo con el número de placas neuríticas, siendo máximo en el cerebro del individuo con SD de 51 años.

5.- LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN UN MODELO DE RATÓN TRISÓMICO DE DOWN, Ts65DN

Los ratones trisómicos Ts65DN se caracterizan porque desarrollan placas seniles y ovillos neurofibrilares, alteraciones de la plasticidad sináptica, degeneración colinérgica y astrocitos hipertróficos. Por todas estas razones constituyen un buen modelo para el estudio del SD y la EA. Por ello, quisimos estudiar si los resultados obtenidos en el cerebro de pacientes con SD son reproducibles con los de ratones Ts65DN. Para ello, realizamos técnicas inmunohistoquímicas y RT-PCR.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas no se observaron cambios en la expresión y la distribución de los receptores CB₁, CB₂ y FAAH en los ratones transgénicos en comparación con los ratones control a ninguna de las edades estudiadas. La distribución de ambos elementos del sistema cannabinoide es neuronal, mayoritariamente en áreas como la corteza o el hipocampo.

Mediante RT-PCR observamos que no existen diferencias en los niveles de ARNm de los receptores CB₂ entre controles y transgénicos ni en los grupos de 8-9 meses ni en los de 12-14 meses de edad ($p=0.89$ y $p=0.87$, respectivamente). Sin embargo, se observan mayores niveles de ARNm de este tipo de receptores en animales transgénicos en el grupo de edad 16-19 meses, aunque este cambio no alcanzó significación estadística ($p=0.07$) (Figura 19A). Los cambios de expresión de este tipo de receptores tienen lugar en los grupos de edad más avanzada en los que existe un mayor número de depósitos de β -amiloide y un mayor progreso de la patología.

En cuanto a los niveles del ARNm de FAAH, no se observaron cambios significativos en ratones transgénicos a ninguna de las edades estudiadas: 8-9 meses ($p=0.3$), 12-14 meses ($p=0.38$) y 16-19 meses ($p=0.64$) (Figura 19B).

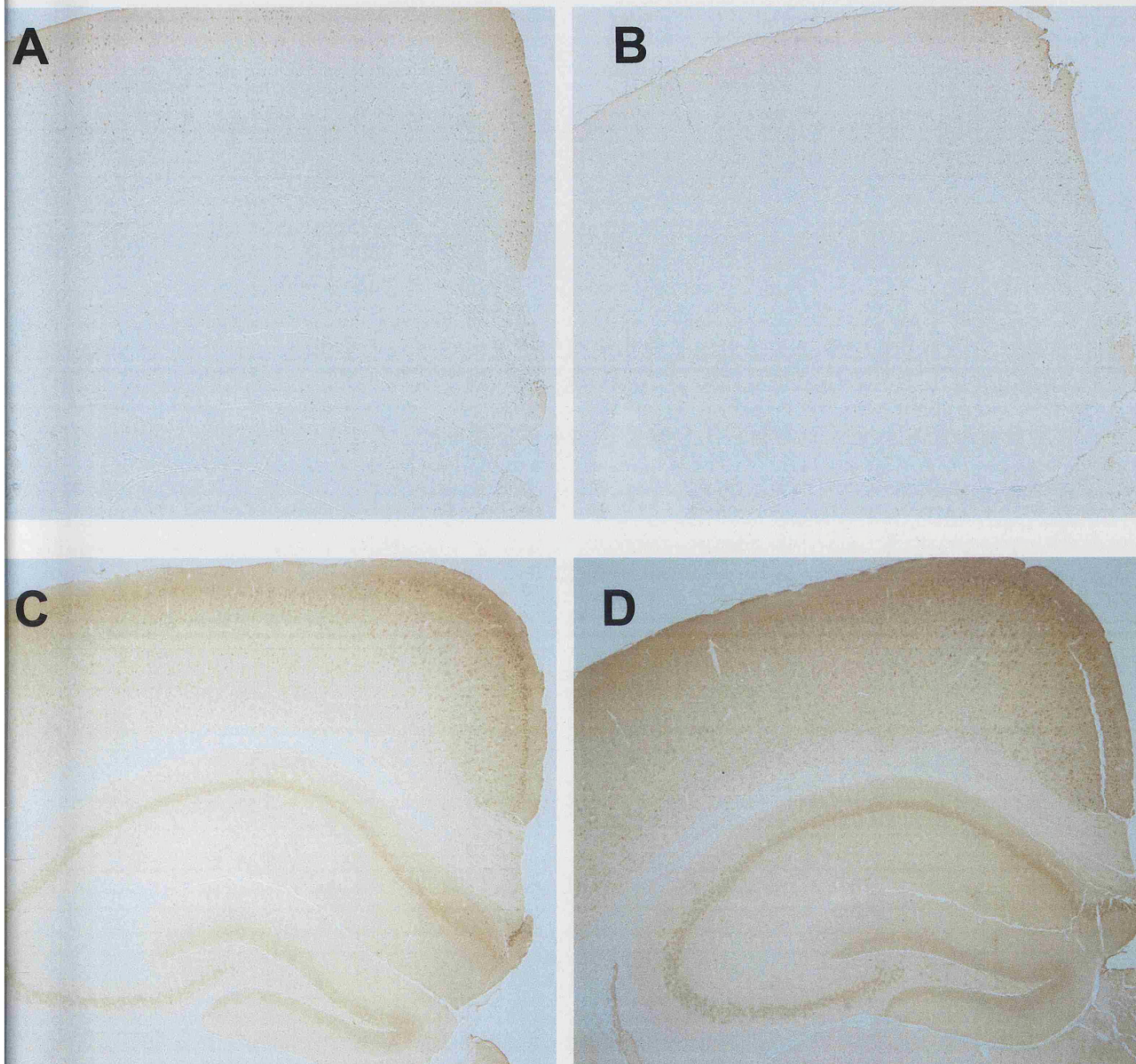


Figura 18.- Marcaje de CB₁ en un ratón control (A) y en un ratón transgénico (Ts65DN) (B). Marcaje de FAAH en un ratón control (C) y en un ratón transgénico (D). En ambos casos se observa un marcaje en elementos neuronales de la corteza y el hipocampo.

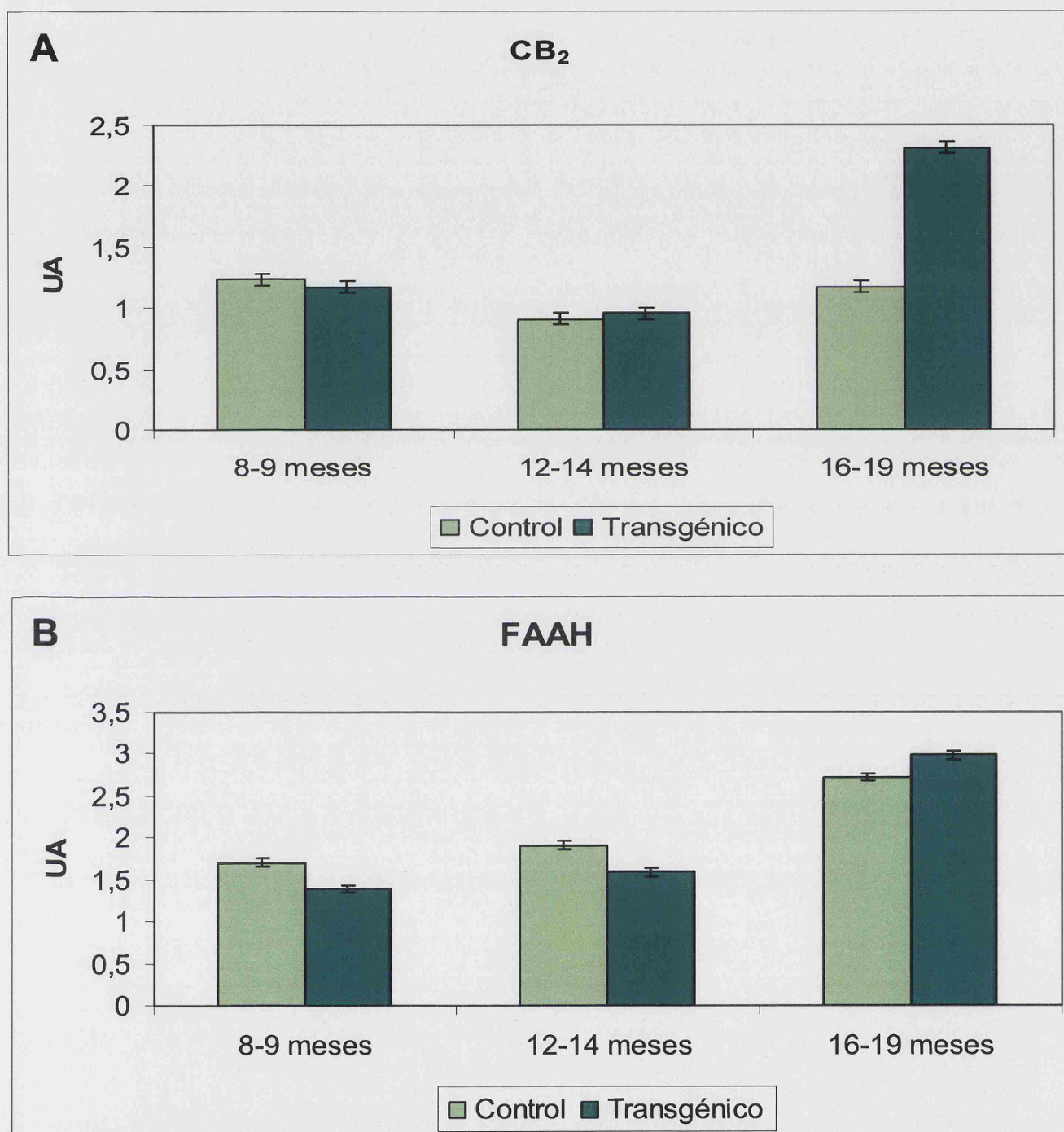


Figura 19.- Niveles del ARNm del receptor CB₂ y la enzima FAAH en ratones transgénicos Ts65DN y ratones control de 8 a 19 meses. (A) Niveles de ARNm del receptor CB₂ en animales de 8-9 meses, de 12-14 meses y de 16-19 meses medidos en unidades arbitrarias. No se observan cambios en los niveles de expresión en los grupos de 8-9 y 12-14 meses de edad ($p=0.89$ y $p=0.87$, respectivamente). Se observa un aumento no significativo de los niveles de ARNm en animales transgénicos con respecto a animales control en el grupo de 16-19 meses ($p=0.07$). **(B)** Niveles del ARNm de FAAH en animales de 8-9, 12-14 y 16-19 meses medidos en unidades arbitrarias. No se observan cambios a ninguna de las edades estudiadas ($p=0.3$, $p=0.38$ y $p=0.64$, respectivamente).

6.- RELEVANCIA FUNCIONAL DE LOS CAMBIOS DE LOS ELEMENTOS DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Tras observar los cambios en la distribución y la expresión de los distintos elementos del SCE, decidimos estudiar el significado funcional de dichos cambios. Como los receptores CB₂ se expresan en células de microglía asociadas a las placas seniles y la FAAH en astrocitos en la vecindad de las placas, diseñamos un experimento para ver la función de estos elementos en la retirada del péptido β -amiloide. El objetivo principal de este bloque es estudiar su función en la retirada del péptido β -amiloide *in situ*, considerada una de las estrategias terapéuticas más relevantes en esta enfermedad. Para ello, se realizaron experimentos *in vitro* que consistían en incubar secciones de tejido del cerebro de pacientes con la EA en presencia de células de astrocitoma y células derivadas de macrófagos THP-1 y comprobar la capacidad de las mismas para fagocitar el péptido β -amiloide. Posteriormente, se realizaron los mismos experimentos adicionando al medio un agonista cannabinoide CB₂ para estudiar la función de este tipo de receptores sobre la capacidad fagocítica de las células. La capacidad fagocítica se expresa en forma de cambios en el área relativa de placas, que es la superficie total del tejido que se encuentra ocupada por las mismas; y se determina mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Se sabe que ambos tipos celulares expresan receptores CB₂ (Aguado y cols., 2007; Mackie y cols., 2007; Klegeris y cols., 2003).

Los experimentos *in vitro* muestran que la línea de astrocitoma U373MG no posee la capacidad de retirar el péptido β -amiloide *in situ*. Como se observa en la gráfica, el área relativa de placas es similar en los tejidos incubados en ausencia y en presencia de células, y el vehículo utilizado en los experimentos (DMSO) no tiene ningún efecto en la acción de las células. El agonista cannabinoide JWH-015 no modifica esta acción en este tipo de células, ya que no se observan diferencias significativas en el área relativa de placas a ninguna de las concentraciones del compuesto utilizadas (Figura 20B).

Los macrófagos derivados de monocitos THP1 tampoco poseen la capacidad de retirar el A β *in situ*, ya que el área relativa de placas es similar en los tejidos incubados en ausencia de células con respecto a los incubados en presencia de las mismas, y el DMSO carece de efecto sobre las células. Sin embargo, al añadir el JWH-015 se observa una disminución significativa del área relativa de placas dependiente de la concentración: la disminución es del $39\% \pm 13\%$ para la concentración de 1nM y del $64\% \pm 9\%$ y $64\% \pm 8\%$ para las concentraciones de 5 y 10nM, respectivamente. La disminución observada del área relativa de placas indica un aumento de la capacidad fagocítica de las células. A la concentración más elevada, 100nM, se observa un menor efecto, con una disminución del área relativa de placas del $28\% \pm 4\%$ (Figura 20C).

Para corroborar que el efecto sobre la capacidad de retirada de β -amiloide está mediado por receptores CB₂, se realizaron los experimentos descritos anteriormente incubando las células en presencia del antagonista selectivo CB₂, SR144528 (25nM), y el agonista JWH-015. Se observó que a la concentración de 25nM el efecto del JWH-015 sobre la capacidad fagocítica de las células se revierte completamente (Figura 20D).

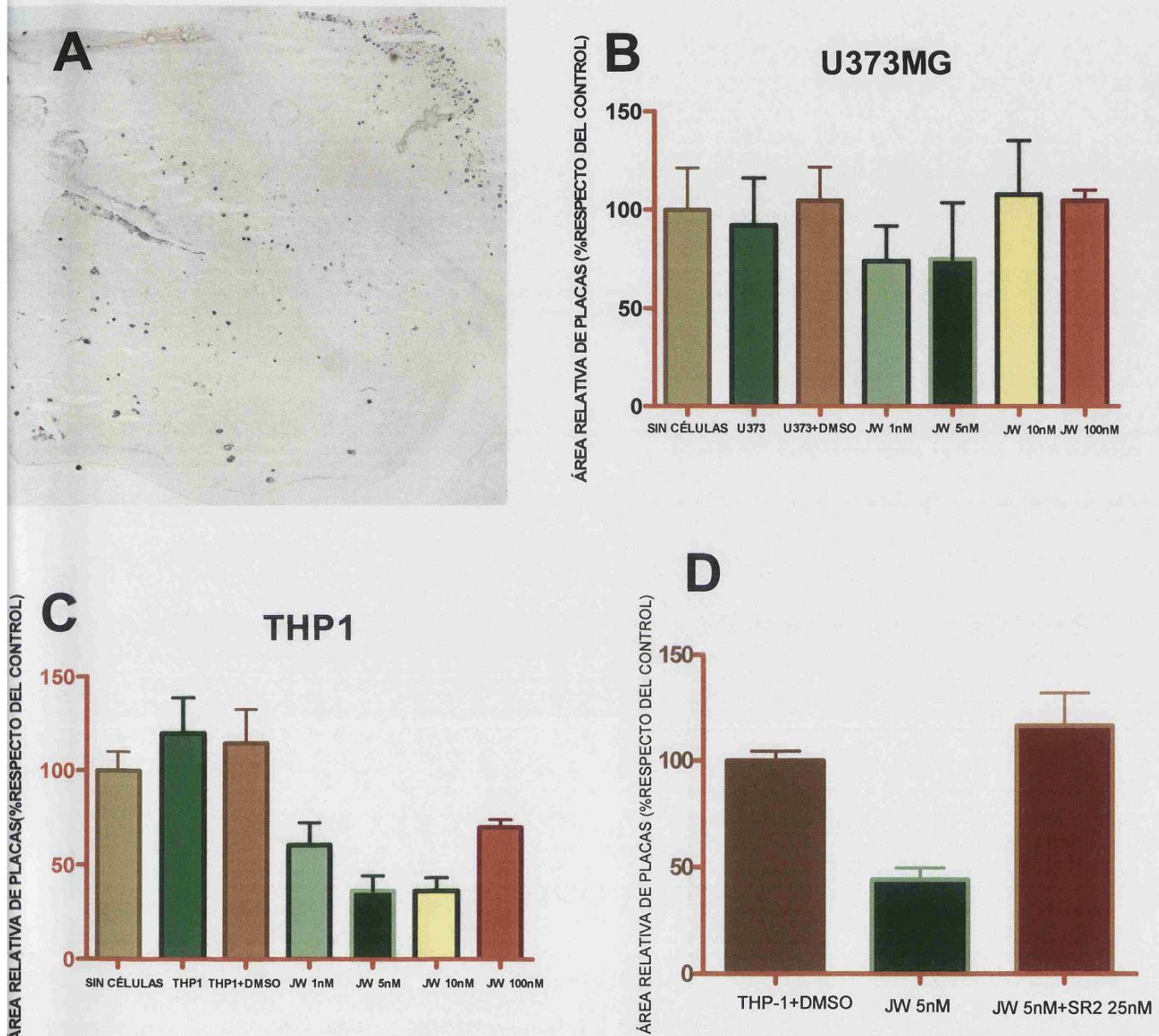


Figura 20.- Efecto del agonista cannabinoide JWH-015 en la capacidad fagocítica de péptido beta-amiloide. (A) Marcaje inmunohistoquímico para detectar las placas de β -amiloide. (B) Efecto del agonista cannabinoide JWH-015 en la capacidad fagocítica de las células del astrocitoma U373MG. El agonista no activa la capacidad fagocítica en estas células. (C) Efecto del JWH-015 en la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de monocitos THP-1. El agonista activa la capacidad fagocítica de estas células de forma dosis-dependiente. Para la concentración del agonista 1nM se obtiene una disminución del área relativa de placas del 39%, para las de 5 y 10nM una disminución del 64%, y para la de 100nM del 30% (Kruskal-Wallis $p < 0.05$). (D) Efecto del antagonista cannabinoide SR144528 en la capacidad fagocítica del péptido β -amiloide de células THP-1. A la concentración de 25nM el antagonista es capaz de revertir de forma significativa el efecto del JWH-015 completamente.

DISCUSIÓN

El diseño del presente trabajo pretendía abordar varios aspectos del SCE que todavía no habían sido estudiados con detalle. En primer lugar, los datos existentes acerca de la distribución general de algunos de los más relevantes elementos constituyentes de este sistema en el SNC humano eran escasos (caso del receptor CB₂ o de la enzima FAAH) o carecían de una resolución celular apropiada (caso del receptor CB₁). Aunque existían elegantes estudios previos acerca de su distribución en otras especies de mamíferos (principalmente rata y ratón), tan sólo se conocían datos autorradiográficos acerca de la presencia de estos elementos en el SNC humano. Nuestra propuesta fue, por tanto, la de hacer una descripción detallada de la localización celular de los receptores CB₁ y CB₂ y de la enzima FAAH en muestras postmortem de tejido cerebral humano.

A continuación, decidimos afrontar el estudio acerca del estado de esos mismos elementos del SCE en el cerebro humano de pacientes con enfermedad de Alzheimer. El indudable potencial terapéutico como agentes neuroprotectores y antiinflamatorios de los cannabinoides, reforzaba el interés de este planteamiento. Dado el elevado nivel de conocimiento que hoy en día poseemos sobre las características neuropatológicas de esta enfermedad neurodegenerativa y su tremendo impacto socioeconómico en sociedades avanzadas con una alta esperanza de vida como la nuestra, parecía relevante abordar los posibles cambios en el patrón de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ y de la enzima FAAH en algunas regiones cerebrales de muestras procedentes de pacientes aquejados de esta enfermedad. De forma adicional, el uso de muestras de pacientes con síndrome de Down, nos permitió estudiar el curso temporal de estos cambios y establecer parcialmente una relación directa entre la aparición de depósitos del péptido β-amiloide y las alteraciones en la expresión de receptores CB₂ y la enzima FAAH.

Estos trabajos se vieron complementados con el uso de muestras animales procedentes de modelos transgénicos de ambas patologías. Como primera aproximación, los resultados que se han presentado en este trabajo

tenían por objetivo establecer si en estos modelos experimentales se presentaban cambios similares a los observados en el SNC humano. La ausencia de dichos cambios, como se discutirá a continuación, no excluye necesariamente al SCE como posible diana terapéutica ni agota el razonamiento argumental sobre su posible relevancia neuroprotectora y/o antiinflamatoria.

Finalmente y, ante las observaciones realizadas, decidimos intentar arrojar luz sobre su posible significado funcional, ligándolo además a su posible proyección terapéutica. Para ello diseñamos una serie de experimentos *in vitro* en los que, mediante el uso de muestras y líneas celulares de origen exclusivamente humano, pudimos apuntar el interés de agentes agonistas CB₂ como posibles herramientas que favorecieran la eliminación de los depósitos proteicos aberrantes que subyacen a la patología de la EA.

BLOQUE 1: LOCALIZACIÓN DE DIVERSOS ELEMENTOS DEL SCE EN EL CEREBRO HUMANO SANO

Receptores CB₁

La masiva presencia de receptores del tipo CB₁ en el SNC es una de las más llamativas peculiaridades del SCE. Los datos pioneros obtenidos en los laboratorios de la Dra. Howlett (1988) y del Dr. Herkenham (1990) permitieron llevar a cabo una exhaustiva caracterización del patrón de expresión de estos receptores celulares en el SNC de diversas especies animales y, de forma muy destacada, de la rata y del ratón. Más aún, la descripción detallada de su localización celular realizada por Tsou y cols (1998) nos sirvió de excelente orientación para la interpretación de nuestros datos.

Respecto al SNC humano, los datos obtenidos en nuestro laboratorio vinieron a confirmar, en gran medida, las observaciones previamente publicadas. Los receptores CB₁ están presentes en prácticamente todas las regiones analizadas, tanto en cuerpos celulares como en proyecciones y terminales nerviosos. Su presencia fue observada en células piramidales de la corteza e hipocampo, en caudado-putamen y globo pálido, cuerpos celulares y fibras de la *substantia nigra*, y cuerpos celulares y dendritas de las células granulares y células de Purkinje del cerebelo. Por el contrario, el marcaje fue menor en las células del núcleo mamilar del hipotálamo, en los cuerpos celulares de los núcleos olivar inferior y dentado, y en las neuronas motoras del asta anterior de la sustancia gris de la médula espinal.

Cabe destacar algunas diferencias significativas respecto a lo observado en el cerebro de la rata. En primer lugar, respecto a las células piramidales del hipocampo, nosotros encontramos un marcaje claro en cuerpos celulares que, sin embargo, no aparece en secciones de tejido cerebral de rata. De acuerdo con Tsou y cols (1998), en el hipocampo de la rata los receptores CB₁ se hallan

localizados en grandes interneuronas inhibitorias (GABAérgicas) así como en las terminaciones nerviosas que rodean y alcanzan los somas de las células piramidales hipocampales, los cuales no presentan niveles significativos de marcaje. Hay que destacar aquí la discrepancia existente entre estos datos y los presentados por Marsicano y cols (2003), quienes encontraron datos que apuntan a la existencia de una población de receptores CB₁ funcionalmente activos en las células piramidales del hipocampo del ratón. Por otra parte, los datos de microscopía electrónica publicados por el grupo del Dr. Freund (1999) también parecen descartar la presencia de receptores CB₁ en el hipocampo en el cerebro humano. No tenemos una explicación clara para estas discrepancias, más aún si se considera que el anticuerpo contra el receptor CB₁ utilizado es el mismo en todos los casos (procedente del laboratorio del Dr Mackie).

Otras regiones y tipos celulares en los que se encontraron discrepancias respecto a datos publicados previamente conciernen a la parte compacta de la *substantia nigra* así como a las células de Purkinje de la corteza cerebelosa. En el primer caso, es bien sabido que, al menos en la rata, los receptores CB₁ se encuentran mayoritariamente localizados en las terminales GABAérgicas que, procedentes del estriado y del pálido, alcanzan la parte reticular de esta estructura mesencefálica. Los trabajos llevados a cabo mediante el uso de diversas toxinas (ácido iboténico y 6-OH-dopamina) permitieron realizar esta precisión anatómica, si bien es cierto que una pequeña población de receptores CB₁ es todavía detectable tras la deaferenciación con ácido iboténico, indicando su localización en terminales subtalámiconigrales o en elementos somáticos locales de la propia *substantia nigra*. En nuestras muestras el marcaje de receptores CB₁ alcanza ambas porciones de la *substantia nigra*, tanto en fibras terminales de la parte *reticulata* como en cuerpos neuronales localizados en la parte compacta.

Finalmente, Tsou y cols. describieron en detalle la localización de los receptores CB₁ en la corteza del cerebelo de la rata, concluyendo que ésta se limitaba a las células en cesta que ocupan una porción perisomática de las células

de Purkinje. Datos adicionales, tanto morfoanatómicos (Herkenham y cols., 1991) como funcionales (Regehr y Beierlein, 2006) parecen reforzar esta apreciación. En nuestras muestras, sin embargo, el marcaje positivo para CB₁ resultó evidente tanto en el soma como en las proyecciones dendríticas de este tipo de células. Es importante destacar que el grupo de Regehr (2006) ha demostrado que los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados en muchos tipos de sinapsis, incluyendo las de naturaleza excitatoria e inhibitoria que modulan la actividad de las células de Purkinje, a través de los receptores del tipo CB₁. Estos autores afirman, además, que otros mecanismos adicionales son necesarios para poder explicar la diversidad de efectos observados.

Una posible explicación a estas discrepancias puede encontrarse en los distintos procedimientos de fijación del tejido cerebral humano, así como en posibles variaciones en las condiciones que rodearon el fallecimiento de los donantes o el intervalo postmortem. Mientras que es bien sabido que el proceso de fijación del tejido cerebral es un factor crítico en la técnica inmunohistoquímica, se conoce poco acerca de la influencia de los otros factores mencionados. Los trabajos de Young y Penney en la década de los 90 sugieren que, efectivamente, esos factores pueden ser críticos a la hora de explicar importantes diferencias en cuanto a los resultados del marcaje con anticuerpos o en la detección de ARNm mediante hibridación *in situ*. Finalmente, la posible existencia de diferencias inter-especies, tanto cualitativas como cuantitativas, no debe ser descartada.

De lo dicho en esta sección podemos concluir que, en nuestras condiciones de trabajo, el marcaje de receptores CB₁ parece ser más elevado que lo descrito por otros autores. Desde el punto de vista de su interpretación cualitativa y funcional, estas variaciones apuntarían a un mayor protagonismo de estos receptores en los procesos de memoria (hipocampo) y control de la actividad motora (cerebelo y *substantia nigra*).

Receptores CB₂.

Uno de los descubrimientos más relevantes del presente trabajo es la descripción de la presencia de bajos niveles de expresión del receptor CB₂ en el SNC humano (no patológico). Hasta hace pocos años, se aceptaba que los receptores del tipo CB₂ no estaban presentes en el SNC, sino que su localización estaba restringida a elementos celulares del sistema inmune en la periferia (Howlett, 2002). Estudios autorradiográficos y funcionales realizados con ratones a los que se les había deleccionado el receptor CB₂ así parecían corroborarlo. Sin embargo, el desarrollo de técnicas más sensibles ha permitido el descubrimiento de poblaciones discretas de este tipo de receptor en el SNC del ratón, la rata, el hurón y, según nuestros datos, el ser humano.

La presencia de receptores CB₂ en una subpoblación celular tan específica como es la microglía perivascular es coherente con el papel inmunoregulador que se ha atribuido a este tipo de receptores. Las células de la microglía perivascular (también denominadas “pericitos” o “macrófagos perivasculares”) desempeñan importantes funciones en la fisiología del SNC y, en concreto, de la barrera hematoencefálica. Así, participan en el control de la entrada de agentes externos al interior del SNC (función de “inmunovigilancia”) y, mediante la producción de sustancias específicas (como las prostaglandinas), se piensa que también pueden condicionar el tono vascular. Además, su privilegiada localización (inmediatamente por detrás de la barrera formada por las células endoteliales y en íntimo contacto con ellas) les permite ejercer un papel fundamental en el control de la entrada de agentes potencialmente infecciosos al SNC. En concreto, se sabe que diversos virus capaces de alcanzar el SNC y desencadenar procesos inflamatorios y encefalitis (como por ejemplo el VIH-1) tienen a estas células como dianas directas. Así, estas células son rápidamente infectadas una vez producido el contagio del individuo y en ellas el virus puede permanecer latente durante largos períodos de tiempo (incluso años). Por estímulos aún no completamente conocidos, la activación de la replicación viral

en las células de la microglía perivascular desencadenará la expansión del proceso infeccioso al parénquima cerebral y la muerte masiva de neuronas que culminará en un cuadro clínico de demencia. Datos posteriores obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la expresión de CB₂ en pericitos se ve aumentada como consecuencia de la infección viral (Benito y cols. 2005), lo que sugiere su participación en la respuesta microglial.

Otros autores han informado de la presencia de receptores CB₂ en otras poblaciones celulares distintas a la microglía perivascular, en otras especies de mamíferos. Así, Skaper y cols. (1996) fueron los primeros en presentar datos acerca de la expresión de estos receptores en el cerebelo de ratones sometidos a un daño excitotóxico. Sin embargo, no pudieron concluir si dicha expresión se producía en condiciones basales o era consecuencia de las condiciones experimentales utilizadas en su estudio.

Por otra parte, la presencia de receptores CB₂ también ha sido descrita en cultivos de ganglios del asta dorsal de la rata así como en células de neuroblastoma. Incluso, Sokal y cols. (2003) han sugerido su posible expresión en neuronas sensoriales primarias. En su conjunto, estos datos sugieren la existencia de poblaciones neuronales de CB₂. Esta apreciación se vio posteriormente confirmada con los datos de Van Sickle y cols. (2005), quienes han identificado la existencia de receptores CB₂ funcionales en el tallo cerebral así como su participación en el control de diversos procesos cerebrales y, de forma destacada, en el control del reflejo del vómito.

FAAH

La enzima amido hidrolasa de ácidos grasos es la responsable de la degradación de la AEA, uno de los principales endocannabinoides. Aunque en un principio se pensó que también participaba en la degradación del 2-AG, estudios posteriores han indicado que su contribución a la hidrólisis de este endocannabinoide es muy reducida, llevada a cabo principalmente por la MAGL.

La distribución de FAAH en células piramidales de la corteza e hipocampo, en células de Purkinje en el cerebelo y en células de los ganglios basales coincide con las áreas en las que se ha observado la degradación de AEA (Hillard y cols., 1995). Además, las neuronas que expresan FAAH se encuentran próximas a neuronas que muestran un marcaje muy intenso para receptores CB₁ (Tsou y cols., 1998). Esta proximidad en la localización de ambos componentes del SCE apoya la hipótesis de que FAAH es el enzima encargado de inactivar la AEA en sus lugares de acción, los receptores CB₁. Sin embargo, en otras regiones del cerebro no se observa dicha correlación, lo cual podría explicarse por el hecho de que el enzima puede tener otros sustratos no cannabinoides (Cravatt y cols., 1995) o que la AEA tenga otras rutas para su metabolismo.

La presencia de FAAH en la *substantia nigra* también es muy relevante, indicando que esta estructura cerebral es un lugar específico de acción de los compuestos cannabinoides. Las neuronas que contienen melanina de la *substantia nigra pars compacta* expresan este enzima de forma muy intensa, tanto en los cuerpos celulares como en los terminales. Estos resultados muestran que el enzima se expresa preferentemente en neuronas eferentes catecolaminérgicas así como en neuronas aferentes GABAérgicas en la *substantia nigra pars reticulata*, todas ellas estructuras que forman parte del circuito estriatonigral-nigroestriatal de los ganglios basales.

Las células de Purkinje y las del núcleo dentado del cerebelo expresan elevados niveles de FAAH, mientras que las neuronas piramidales corticales y las neuronas del caudado-putamen muestran niveles intermedios del enzima. La presencia del enzima en este tipo de células apoya los datos de otros autores acerca del papel de los cannabinoides en el control motor (Pertwee, 1997). Numerosos autores han descrito que la administración exógena de cannabinoides produce importante efectos motores (Pertwee, 1997), y la enzima FAAH controla en buena medida la duración de estos efectos, ya que los análogos de la AEA más resistentes a la degradación o los cannabinoides clásicos derivados de la planta que no son degradados por el enzima producen efectos inhibitorios más prolongados (Romero y cols., 1995; Romero y cols., 1996). Por otra parte, la FAAH es una posible diana terapéutica para el abordaje de trastornos motores como la enfermedad de Parkinson (Morgese y cols., 2007) y es capaz de modular los niveles de dopamina cerebral (Murillo-Rodríguez y cols., 2007).

Finalmente, la presencia de FAAH en astrocitos perivasculares sugiere que este sistema puede participar en la regulación del tono sanguíneo en el cerebro (Gebremedhin y cols., 1999) y en el control de la funcionalidad de la barrera hematoencefálica.

Por tanto, podemos concluir que la distribución de la enzima FAAH en el SNC humano es coincidente con la descrita previamente en otras especies animales y muy similar a la observada para los receptores CB₁, lo que apunta a una estrecha relación entre la diana del ligando AEA y los mecanismos para su degradación.

BLOQUE 2: LOCALIZACIÓN DE DIVERSOS ELEMENTOS DEL SCE EN EL CEREBRO HUMANO AFECTADO POR LA EA Y EL SÍNDROME DE DOWN Y EN MODELOS ANIMALES RELACIONADOS

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo revelan que el SCE experimenta profundos cambios como consecuencia de una patología neurodegenerativa crónica como la EA. Más aún, los datos obtenidos a partir de muestras de donantes con SD nos permiten establecer un nexo entre estos cambios y la aparición de depósitos aberrantes de péptido β amiloide como fenómeno desencadenante de los mismos.

Como es sabido, la aparición de esos precipitados proteicos desencadena grandes cambios en el fenotipo de las células gliales, principalmente las localizadas en la vecindad de los mismos, lo cual se traduce en un fenómeno denominado “gliosis” y en la instauración de un cuadro de inflamación local intensa, que perpetúa el daño tisular y conduce a la muerte de las neuronas vecinas. Nuestros datos nos permiten postular a los receptores CB₂ y a la enzima FAAH como marcadores adicionales de este proceso. Más aún, podemos afirmar que la inducción selectiva en la expresión de estos elementos del SCE es un fenómeno ligado a la deposición del péptido β -amiloide, ya que no se da en individuos jóvenes afectados por el SD ni en individuos de edad avanzada sanos (en los que no se presentan este tipo de depósitos) y sí lo hace en muestras de adultos de edad avanzada, que desarrollan una patología similar a la de la EA.

En concordancia con lo descrito por otros grupos, nuestros datos no sugieren una inducción glial de receptores CB₁ en el SNC humano de pacientes con EA ni con SD. La densidad de este tipo de receptores en el hipocampo y ganglios basales está disminuida, aunque no ocurre así en la corteza frontal. Además, su acoplamiento a los mecanismos de transducción de señal a través de proteínas G está disminuido, tal y como ha sido descrito por Ramírez y cols. (2005) Finalmente, es importante advertir que, aunque no pudimos apreciar

cambios aparentes en el patrón de expresión de los receptores CB₁, su posible papel en el abordaje terapéutico de la EA, derivado tanto del efecto neuroprotector de su activación como de su posible presencia (si quiera en niveles muy bajos) en elementos microgliales, no debe ser descartado. De hecho, aunque los efectos psicoactivos de los cannabinoides han limitado en buena medida los estudios en humanos, fármacos compuestos por este tipo de moléculas se usan en la práctica clínica, fundamentalmente como estimuladores del apetito y antieméticos. Volicer y cols. (1997) publicaron un estudio en el que el uso del dronabinol (en cuya composición entra a formar parte el THC) redundó en un efecto beneficioso en pacientes con EA sobre la ganancia de peso así como en una disminución de la agitación nocturna, característica de estos pacientes. Más recientemente, Walther y cols. (2006) llevaron a cabo un estudio piloto en cinco pacientes con EA y observaron que dosis bajas de dronabinol mejoraban de forma significativa su actividad motora, sin apenas efectos secundarios no deseados.

La inducción de la expresión de receptores CB₂ en células microgliales asociadas a las placas neuríticas constituye una observación fundamental en el presente estudio. Como se ha comentado anteriormente, en condiciones basales el receptor CB₂ parece expresarse en niveles bajos y en tipos celulares muy específicos. Sin embargo, la microglía activada ubicada en las placas neuríticas presenta niveles significativamente altos de este receptor. Con posterioridad, hemos podido comprobar un comportamiento semejante en macrófagos y linfocitos infiltrados en áreas de inflamación en otras patologías.

Es importante destacar que Ramírez y cols. (2005) han demostrado que la activación de receptores CB₂ es capaz de bloquear la activación de células de microglía *in vitro* por parte del péptido β -amiloide. Más aún, se sabe que su activación por distintos ligandos modifica de forma significativa la actividad de las células de microglía aunque, curiosamente, esta capacidad parece limitarse a estados en los que la microglía está activada. Walter y cols. (2003) han demostrado que el 2-AG promueve la migración microglial a través de la

activación de receptores CB₂, mientras que Carrier y cols. (2004) demostraron un efecto proliferativo de ese mismo endocannabinoide, también mediado por ese tipo de receptor. Finalmente, Mestre y cols. (2006) y Ortega-Gutiérrez y cols. (2005) han demostrado que los cannabinoides inhiben la actividad microglial e inducen una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de este tipo de células. Podemos concluir que la activación de los receptores CB₂ microgliales favorece un estado de proliferación y movilidad de estas células, al tiempo que previene su conversión hacia un perfil proinflamatorio.

La observación de que la enzima FAAH se sobre-expresa de forma selectiva en astrocitos hipertróficos asociados a los depósitos patológicos de péptido β -amiloide concuerda con los datos obtenidos en otras enfermedades con un componente neuroinflamatorio, tales como la encefalitis inducida por VIH-1 o la esclerosis múltiple. Aunque la presencia de FAAH en astrocitos ya se aprecia en muestras de pacientes sanos, nuestros datos demuestran que tanto la proteína como su actividad enzimática asociada se ven potenciadas en zonas de neuroinflamación. En nuestra opinión, una mayor actividad FAAH en focos neuroinflamatorios puede tener consecuencias proinflamatorias, debido a dos razones: en primer lugar, al descenso en los niveles locales de AEA, endocannabinoide que, se sabe, tiene propiedades neuroprotectoras; y, en segundo lugar, a la generación de ácido araquidónico, como metabolito procedente de la degradación de AEA, junto con la etanolamina. Ambos factores pueden desencadenar una agudización del proceso inflamatorio en las zonas de depósito de los péptidos aberrantes, por lo que especulamos con la posibilidad de que la inhibición de la actividad de esta enzima en este contexto pudiera tener interés terapéutico. Más aún, otros autores han propuesto que también la inhibición de otras enzimas involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico puede tener este valor; tal sería el caso de la fosfolipasa A₂ o la ciclooxigenasa-2, enzimas que también se sobre-expresan en situaciones de neuroinflamación. La hipótesis acerca de la relevancia de la inhibición de la FAAH se ha visto reforzada con los datos de Van der Stelt y cols. (2006) que

indican que la potenciación del tono endocannabinoide en un modelo animal de EA puede tener consecuencias beneficiosas, ya que mejora parámetros comportamentales y reduce la muerte neuronal. Es interesante destacar que estos autores encuentran estos efectos cuando la potenciación se realiza de forma temprana, pero no tardía.

Finalmente, la ausencia de cambios equiparables a los descritos en el SNC humano en el cerebro de los dos modelos de ratón transgénico utilizados nos permite concluir que podemos estar ante un patrón característico del cerebro humano. Es importante resaltar que, aunque se trata de modelos ampliamente aceptados y que reproducen, en la medida de lo posible, la patología en humanos, no son capaces de mimetizar la enfermedad humana en todos sus aspectos. Por destacar algunos aspectos clave, la densidad de placas neuríticas en el modelo 3xTgAD o el grado de gliosis en ambos modelos (3xTgAD y Ts65DN) son significativamente menores que los que se han descrito en el cerebro de pacientes aquejados de estas patologías. Más aún, la existencia de posibles respuestas compensatorias y/o adaptativas en los modelos transgénicos de enfermedad así como la posible existencia de diferencias entre especies, podrían ayudar a explicar el porqué de estas diferencias. En cualquier caso y, como se ha mencionado con anterioridad, es importante remarcar que la ausencia de cambios significativos en el patrón de expresión de CB₁, CB₂ y FAAH en estos ratones, no descarta el posible interés de la modulación del SCE como diana terapéutica en estos procesos, aunque sí obliga a un replanteamiento de las estrategias experimentales a desarrollar en el futuro inmediato. Por ejemplo, la aparente ausencia de inducción de CB₂ en el SNC de estos animales descarta, en principio su posible interés como posible objetivo. Estos datos discrepan de los obtenidos por el grupo de Van der Stelt y cols. (2006), quienes recientemente encontraron una inducción al alza de la expresión de receptores CB₂ en el cerebro de ratas y ratones a los que se había administrado una solución de β -amiloide fibrilar en el parénquima cortical. De forma interesante, no encontraron cambios en los niveles de CB₁ a ninguno de los tiempos examinados. Además de esa inducción de los receptores CB₂, estos autores

observaron un incremento significativo de los niveles de 2-AG como consecuencia de la administración del péptido patogénico. Para explicar esta discrepancia podemos argumentar que se trata de un modelo experimental bastante alejado del de animal transgénico utilizado en nuestro trabajo en el cual el proceso patológico tiene lugar de forma paulatina y no mediante la administración aguda de la proteína.

BLOQUE 3: SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE RECEPTORES CB₂ Y FAAH

Hemos encontrado que el agonista cannabinoide CB₂, JWH-015, es capaz de activar la capacidad de retirada del péptido β -amiloide en los macrófagos derivados de monocitos humanos THP-1 de forma dependiente de la concentración y a concentraciones muy bajas siendo este efecto revertido por el antagonista de receptores CB₂, SR144528. Por el contrario, este compuesto no modifica la acción de las células del astrocitoma humano U373. Estos resultados sugieren que el efecto de este agonista cannabinoide es dependiente del tipo celular y mediado por receptores CB₂.

Se trata del primer estudio que muestra el efecto de un agonista sobre la retirada de A β en muestras humanas y concuerda con los datos previos existentes acerca de los efectos neuroprotectores del SCE. Actualmente, la producción de endocannabinoides en el foco inflamatorio se considera un mecanismo protector endógeno (Mechoulam y Lichtman, 2003). Además, los resultados descritos confirman los obtenidos previamente por el grupo de Ehrhart y cols. (2005), quienes observaron un aumento de la capacidad fagocítica de A β de células de microglía de ratón tras el tratamiento con JWH-015. Cabe destacar que las concentraciones utilizadas por este grupo (5 μ M) son muy superiores a las empleadas en nuestros experimentos (5nM). Además, este grupo observó que el JWH-015 es capaz de inhibir la expresión de CD40 y el efecto inhibitorio de esta molécula sobre la capacidad fagocítica de las células microgliales. También describieron una disminución de la producción de TNF- α y óxido nítrico por parte de dichas células de microglía tras el tratamiento con IFN- γ o A β . Estos datos refuerzan las propiedades anti-inflamatorias de los cannabinoides sobre las células de microglía (Ramírez y cols., 2005) o los macrófagos humanos (Klegeris y cols., 2003).

Algunos autores han apuntado la potenciación de la capacidad fagocítica de la microglía como posible estrategia terapéutica para disminuir la cantidad de

depósitos de β -amiloide (Koenigsknecht y Landreth, 2004). Aunque también se ha observado que los astrocitos son capaces de retirar β -amilooide *in situ* e *in vivo* (Wyss-Coray y cols., 2003), la microglía es la responsable mayoritaria de este proceso (Rogers y cols., 2002). Además, se ha postulado que un defecto en la capacidad fagocítica de las células de microglía podría ser el desencadenante de la acumulación patogénica de A β (Streit, 2004).

También se ha descrito que las propiedades anti-inflamatorias de los agonistas CB₂ favorecen la actividad fagocítica. El grupo de Koenigsknecht-Talboo y Landreth (2005) observó que la adición exógena de citoquinas anti-inflamatorias potencia la retirada de A β en células microgliales de ratón BV-2, mientras que un ambiente pro-inflamatorio inhibe el proceso. Por tanto, podríamos especular que el JWH-015 actúa sobre los receptores CB₂ presentes en los macrófagos derivados de THP-1 disminuyendo la producción de moléculas pro-inflamatorias y aumentando la fagocitosis de A β .

Es importante destacar que el efecto anti-inflamatorio mediado por la activación de receptores CB₂ difiere con lo observado por otros autores que sugieren un efecto pro-inflamatorio de los cannabinoides que actúan sobre este tipo de receptores. Walter y cols. (2003), y Carrier y cols. (2004) mostraron que la activación de receptores CB₂ estimula la migración y proliferación microgliales. Sin embargo, estos resultados no contradicen los resultados obtenidos previamente, ya que el aumento de expresión de las células de microglía en los procesos inflamatorios puede tener también efectos beneficiosos disminuyendo la liberación de citoquinas o, como en este estudio, aumentando la retirada de A β .

CONCLUSIONES

1.- En individuos sanos:

1.1.- Los receptores CB₁ son especialmente abundantes en áreas del cerebro humano implicadas en el control motor, como la corteza motora, el caudado putamen, el globo pálido, la *substantia nigra pars reticulata* y el cerebelo.

1.2.- Los receptores CB₂ se expresan en las células de microglía perivascular, siendo más abundantes en porciones de la sustancia blanca, incluyendo vasos sanguíneos de gran y pequeño calibre.

1.3.- La distribución de FAAH fue muy similar a la encontrada para los receptores CB₁, con los mayores niveles de marcaje en la corteza, el caudado putamen, el globo pálido, la *substantia nigra pars reticulata* y el cerebelo.

2.- La presencia de los receptores CB₁ y la enzima FAAH en estructuras implicadas en el control motor indican que ambos elementos del SCE podrían constituir dianas terapéuticas para el tratamiento de los trastornos del movimiento.

3.- En pacientes con la enfermedad de Alzheimer y el Síndrome de Down:

3.1.- No se observan cambios en la distribución o los niveles de expresión de los receptores CB₁.

3.2.- La expresión de los receptores CB₂ se induce en las células de microglía asociadas a las placas seniles características de ambas patologías.

3.3.- La enzima FAAH se sobre-expresa de forma selectiva en astrocitos hipertróficos asociados a los depósitos del péptido β -amiloide. Además, la actividad del enzima está aumentada en zonas de inflamación por depósitos de A β .

4.- Los cambios observados en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y en el de pacientes con Síndrome de Down, no se correlacionaron en

los modelos transgénicos animales para ambas enfermedades. La ausencia de cambios equiparables a los descritos en humanos en los dos modelos animales puede deberse a que se trata de un patrón característico del cerebro humano, ya que, en buena medida, estos modelos no mimetizan la patología en humanos en sus distintos aspectos.

5.- El agonista cannabinoide CB₂, JWH-015 activa la capacidad de retirada del péptido β-amiloide en cortes de tejido en los macrófagos derivados de monocitos humanos THP-1 de forma dependiente de la concentración y a concentraciones muy bajas. Este efecto es mediado por receptores CB₂. Por el contrario, el agonista cannabinoide CB₂, JWH-015 no es capaz de activar la capacidad de retirada del péptido β-amiloide en las células del astrocitoma humano U373MG.

6.- Los datos obtenidos con el agonista CB₂ sugieren que se trata de un efecto dependiente del tipo celular y mediado a través de receptores CB₂.

7.- La modulación del SCE podría constituir un importante abordaje para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en las que se producen acúmulos proteicos acompañados de procesos neuroinflamatorios.

BIBLIOGRAFÍA

- Abood, M.E., Rizvi, G., Sallapudi, N., McAllister, S.D., Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity, *Neuroscience Letters* 2001, 309(3): 197-201
- Abrams, D., Hilton, J., Leiser, R., Shade, S., Elbeik, T., Aweeka, F., Benowitz, N., Bredt, B., Kosel, B., Aberg, J., Deeks, S., Mitchel, T., Mulligan, K., Bacchetti, P., McCune, J., Schambelan, M., Short-term effects of cannabinoids in patients with HIV-infection, *Ann Intern Med* 2003, 139: 258-266
- Afagh, A., Cummings, B.J., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Tenner, A.J., Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain, *Exp Neurol* 1996, 138: 22-32
- Aguado, T., Palazuelos, J., Monory, K., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells, *The Journal of Neuroscience* 2006, 26 (5): 1551-1561
- Albin, R.L., Young A.B., Penney, J.B., The functional anatomy of basal ganglia disorders, *Trends Neurosci* 1989, 12: 366-375
- Antonarakis, S., Epstein, C., The challenge of Down syndrome, *Trends in Molecular Medicine* 2006
- Araujo, D.M., Cotman, C.W., Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease, *Brain Research* 1992, 569: 141-145
- Arévalo-Martín, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., Guaza, C., Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis, *J Neuroscience* 2003, 23(7):2511-6
- Bahr, B.A., Bendiske, J., Brown, Q., Munirathinam, S., Caba, E., Rudin, M., Urwyler, S., Sauter, A., Rogers, G., Survival signaling and selective neuroprotection through glutamatergic transmission, *Exp Neurol* 2002, 174: 37-47
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T., Di Marzo, V., Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model, *FASEB J.* 2001, 15(2):300-2
- Beal, J.A., Olson, R., Laubenstein, L., Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS, *J Pain Symptom Manage* 1995, 10: 89-97
- Becher, B., Blain, M., Antel, J.P., CD40 engagement stimulates IL-12 p70 production by human microglial cells: basis for Th1 polarization in the CNS, *J Neuroimmunol.* 2000, 102(1):44-50
- Becher, B., Prat, A., Antel, J.P., Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells, *Glia.* 2000, 29(4):293-304
- Begg, M., Pachar, P., Bátka, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F.M., Liu, J., Kunos, G., Evidence for novel cannabinoid receptors, *Pharmacol Ther.* 2005, (2):133-45
- Beierlein, M., Regehr, W.G., Local interneurons regulate synaptic strength by retrograde release of endocannabinoids, *J Neurosci.* 2006, 26(39):9935-43

- Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., Campanella, M., Nicolussi, E., Fredduzzi, S., Reggiani, A., CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms, *Eur J Neurosci.* 2006, 23(6):1530-8
- Beltramo, M., Piomelli, D., Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol, *Neuroreport* 2000, 11: 1231-1235
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, SY., Makriyannis, A., Piomelli, D., Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition, *Science.* 1997, 277(5329):1094-7
- Benamar, K., Geller, E.B., Adler, M.W., Role of the nitric oxide pathway in kappa-opioid-induced hypothermia in rats, *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 303: 375-378
- Benamar, K., McMenamin, M., Geller, E.B., Chung, Y.G., Pinter, J.E., Adler, M.W., Unresponsiveness of mu-opioid receptor knockout mice to lipopolysaccharide-induced fever, *Br J Pharmacol* 2005, 144: 1029-1031
- Benamar, K., Xin, L., Geller, E.B., Adler, M.W., Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a mu-opioid receptor-selective antagonist in rats, *Eur J Pharmacol* 2000, 401: 161-165
- Benito, C., Kim, WK., Chavarría, I., Hillard, CJ., Mackie, K., Tolón, RM., Williams, K., Romero, J., A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis, *J Neurosci.* 2005, 25(10):2530-6
- Benito, C., Núñez, E., Tolón, RM., Carrier, EJ., Rábano, A., Hillard, CJ., Romero, J., Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains, *J Neurosci.* 2003, 23(35):11136-41
- Benito, C., Tolón, R.M., Pazos, R., Núñez, E., Castillo, A.I., Romero, J., Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation, *BrJ Pharmacol.* 2008, 153(2): 277-85
- Bifulco, M., Laezza, C., Portella, G., Vitale, M., Orlando, P., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth, *FASEB J.* 2001, 15(14):2745-7
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Di Marzo, V., Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function, *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 256: 377-380
- Bisogno, T., Melck, D., Bobrov, M.Y., N-acyl-dopamines: novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo, *Biochemistry Journal* 2000, 351: 817-824
- Bisogno, T., Melck, D., De Petrocellis, L., Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase, *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248: 515-522
- Bisogno, T., Sepe, N., Melck, D., Maurelli, S., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells, *Biochem J.* 1997, 322 (2):671-7

- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E., Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease, *Prog Neurobiol* 2000, 62 (1) : 63-88
- Blandini, F., Porter, R.H., Greenamyre, J.T., Glutamate and Parkinson's disease, *Mol Neurobiol* 1996, 12 (1): 73-94
- Blatteis, C.M., Endotoxemic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management, *Pharmacol Ther* 2006, 111: 194-223
- Blázquez, C., Casanova, M.L., Planas, A., Del Pulgar, T.G., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M.J., Aragonés, J., Huffman, J.W., Jorcano, J.L., Guzmán, M., Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids, *FASEB J.* 2003, 17(3):529-31
- Blázquez, C., Sánchez, C., Daza, A., Galve-Roperh, I., Guzmán, M., The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme, *J Neurochem* 1999, 72(4): 1759-68
- Block, R.I., O'Leary, D.S., Ehrhardt, J.C., Effects of frequent marijuana use on brain tissue volume and composition, *Neuroreport* 2000, 11: 491-6
- Boger, D.L., Henriksen, S.J., Cravatt, B.F., Oleamide: an endogenous sleep-inducing lipid and prototypical member of a new class of biological signaling molecules, *Curr Pharm Des* 1998, 4: 303-314
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P., Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1, *Biochem J* 1995, 312 : 637-641
- Bracey, M.H., Hanson, M.A., Masuda, K.R., Stevens, R.C., Cravatt, B.F., Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling, *Science* 2002, 298: 1793-1796
- Bradshaw, H.B., Walker, J.M., The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators, *British Journal of Pharmacology* 2005, 144: 459-465
- Breivogel, C.S., Childers, S.R., Cannabinoid agonist signal transduction in rat brain: comparison of cannabinoid agonists in receptor binding, G-protein activation, and adenylyl cyclase inhibition, *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 (1):328-36
- Breivogel, C.S., Griffin, G., Di Marzo, V., Martin, B.R., Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain, *Mol Pharmacol.* 2001 (1):155-63
- Brotchie, J.M., The neural mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease, *Ann Neurol.* 2000, 47(4 Suppl 1):S105-12
- Brown, A., Wise, A., Identification of modulators of gpr55 activity, US Patent Document Number 20030113814 (2003)
- Brown, R.H. Jr, Amyotrophic lateral sclerosis. Insights from genetics, *Arch Neurol.* 1997, 54(10):1246-50
- Bruce-Keller, A.J., Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery, *J Neurosci Res.* 1999, 58(1):191-201

- Buckley, NE., McCoy, KL., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, CC., Glass, M., Zimmer, A., Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB₂ receptor, *Eur J Pharmacol.* 2000, 396(2-3):141-9
- Bullido, M.J., Valdivieso, F., Apolipoprotein E gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease, *Microsc Res Tech* 2000, 50: 261-267
- Burstein, S., Budrow, J., Debatis, M., Hunter, SA., Subramanian, A., Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid, *Biochem Pharmacol.* 1994, 48(6):1253-64.
- Burstein, S.H., Huang, S.M., Petros, T.J., Rossetti, R.G., Walker, J.M., Zurier, R.B., Regulation of anandamide tissue levels by N-arachidonylglycine, *Biochem Pharmacol* 2002, 64: 1147-1150
- Cabral, GA., Marciano-Cabral, F., Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance, *J Leukoc Biol.* 2005, 78(6):1192-7
- Cacabelos, R., Alvarez, X.A., Fernández Novoa, L., Franco, A., Mangués, R., Pellicer, A., Nishimura, T., Brain interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and vascular dementia, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994, 16: 141-151
- Caffarel, MM., Sarrió, D., Palacios, J., Guzmán, M., Sánchez, C., Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation, *Cancer Res.* 2006, 66(13):6615-21
- Caijaffa, W.T., Vlahov, D., Graham, N.M.H., Astemborski, J., Solomon, L., Nelson, K.E., Munoz, A., Drug smoking, *Pneumocystis carinii* pneumonia, and immunosuppression increase risk of bacterial pneumonia in human immunodeficiency virus-seropositive injection drug users, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1994, 150: 1493-1498
- Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., Control of pain initiation by endogenous cannabinoids, *Nature* 1998, 394: 277-281
- Carlisle, SJ., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., Cabral, GA., Differential expression of the CB₂ cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation, *Int Immunopharmacol.* 2002, 2(1):69-82
- Carrier, EJ., Kearn, CS., Barkmeier, AJ., Breese, NM., Yang, W., Nithipatikom, K., Pfister, SL., Campbell, WB., Hillard, CJ., Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB₂ receptor-dependent mechanism, *Mol Pharmacol.* 2004, 65(4):999-1007
- Carroll, C.B., Bain, P.G., Teare, L., Liu, X., Joint, C., Wroath, B.A., Parkin, S.G., Fox, P., Wright, D., Hobart, J., Zajicek, J.P., Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease, *Neurology* 2004, 63: 1245-1250
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997, 389: 816-824

- Caulfield, M.P., Brown, D.A., Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via perussis toxin-sensitive mechanism, *Br J Pharmacol* 1992, 106: 231-2
- Childers, S.R., Breivogel, C.S., Cannabis and endogenous cannabinoid systems, *Drug Alcohol Depend* 1998, 51(1-2): 173-87
- Chu, C.J., Huang, S.M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S.A., Miller, J.D., Zipkin, R.E., Daddario, N., Appendino, G., Di Marzo, V., Walker, J.M., N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hiperalgesia, *J Biol Chem* 2003, 278: 13633-13639
- Cleveland, DW., Rothstein, JD., From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS, *Nat Rev Neurosci.* 2001, 2(11):806-19
- Cleveland, DW., Rothstein, JD., From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS, *Nat Rev Neurosci.* 2001, 2(11):806-19
- Colpaert, FC., Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat, *Neuropharmacology.* 1987, 26(9):1431-40
- Compston, A., Coles, A., Multiple sclerosis, *Lancet* 2002, 359(9313): 1221-31
- Compston, A., Coles, A., Multiple sclerosis, *Lancet.* 2002, 359(9313):1221-31
- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P., Relapses and progression of disability in multiple sclerosis, *N Engl J Med* 2000, 343(20): 1430-8
- Consroe, P., Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders, *Neurobiol Dis.* 1998, 5(6 Pt B):534-51
- Consroe, P., Laguna, J., Allender, J., Snider, S., Stern, L., Sandyk, R., Kennedy, K., Schram, K., Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1991, 70: 701-708
- Cooper, J.D., Salehi, A., Delcroix, J.D., Howe, C.L., Belichenko, P.V., Couzens, J.C., Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion, *Proc Natl Acad Sci* 2001, 98: 10439-10444
- Corder, EH., Huang, R., Cathcart, HM., Lanham, IS., Parker, GR., Cheng, D., Smith, S., Poduslo, SE., Membership in genetic groups predicts Alzheimer disease, *Rejuvenation Res.* 2006, 9(1):89-93
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Supersensitivity to anadamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 9371-9376
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides, *Nature* 1996, 384: 83-87

- Cravatt, BF., Prospero-Garcia, O., Siuzdak, G., Gilula, NB., Henriksen, SJ., Boger, DL., Lerner, RA., Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep, *Science*. 1995, 268(5216):1506-9
- Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V., Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 2006, 139: 1405-1415
- Croxford, JL., Miller, SD., Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212, *J Clin Invest*. 2003, 111(8):1231-40
- Curtis, A., Richards, H., Nabilone could treat chorea and irritability in Huntington's disease, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2006, 18: 4
- Dal Canto, MC., Lipton, HL, Multiple sclerosis. Animal model:Theiler's virus infection in mice, *Am J Pathol*. 1977, 88(2):497-500
- Dal Canto, MC., Lipton, HL., Multiple sclerosis. Animal model:Theiler's virus infection in mice, *Am J Pathol*. 1977, 88(2):497-500
- D'Ambra, TE., Estep, KG., Bell, MR., Eissenstat, MA., Josef, KA., Ward, SJ., Haycock, DA., Baizman, ER., Casiano, FM., Beglin, NC., Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor, *J Med Chem*. 1992, 35(1):124-35
- Darmani, N.A., The potent emetogenic effects of the endocannabinoid 2-AG (2-arachidonoylglycerol) are blocked by delta(9)-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids, *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 300(1): 34-42
- Davisson, M.T., Schmidt, C., Akeson, E.C., Segmental trisomy for murine chromosome 16: a new system for studying Down syndrome, *Prog Clin Biol Res* 1990, 360: 263-280
- De Lago, E., Ligresti, A., Ortar, G., Morera, E., Cabranes, A., Pryce, G., Bifulco, M., Baker, D., Fernandez-Ruiz, J., Di Marzo, V., In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake, *Eur J Pharmacol*. 2004, 484(2-3):249-57
- De Mendonca, A., Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A., Adenosine: does it have a neuroprotective role after all?, *Brain Res*. 2000, 33: 258-274
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Davis, J.B., Pertwee, R.G., Di Marzo, V., Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor:inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity, *FEBS Letters* 2000, 483: 52-56
- De Petrocellis, L., Cascio, M.G., Di Marzo, V., The endocannabinoid system: a general view and latest additions, *British Journal of Pharmacology* 2004, 141: 765-774
- De Strooper, B., Woodgett, J., Alzheimer's disease: Mental plaque removal, *Nature* 2003, 423(6938):392-3
- Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Childers, S.R., Functional significance of cannabinoid receptors in brain, *London Academic Press* 1995, p. 206-31

- Denovan-Wright, EM., Robertson, HA., Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice, *Neuroscience*. 2000, 98(4):705-13
- Derocq, JM., Jbilo, O., Bouaboula, M., Ségui, M., Clère, C., Casellas, P., Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation, *J Biol Chem*. 2000, 275(21):15621-8
- Deutsch, D.G., Chin, S.A., Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist, *Biochem Pharmacol* 1993, 46: 791-796
- Deutsch, D.G., Goligorsky, M.S., Schmid, P.C., Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney, *J Clin Invest* 1997a, 100: 1538-1546
- Deutsch, D.G., Lin, S., Hill, W.A., Morse, K.L., Salehani, D., Arreaza, G., Omeir, R.L., Makriyannis, A., Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 231: 217-221
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 1992, 258: 1946-1949
- Devane, WA., Dysarz, FA., Johnson, MR., Melvin, LS., Howlett, AC., Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain, *Mol Pharmacol*. 1988, 34(5):605-13
- Dewey, WL., Cannabinoid pharmacology, *Pharmacol Rev*. 1986, 38(2):151-78
- Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L., Endocannabinoids and multiple sclerosis: a blessing from the 'inner bliss'?, *Trends Pharmacol Sci*. 2000, 21(6):195-7
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Anandamide: some like it hot, *Trends Pharmacol Sci*. 2001, 22(7):346-9
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Endocannabinoids: new targets for drug development, *Curr Pharm Des*. 2000, 6(13):1361-80
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J.A., Kunos, G., Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages, *Eur J Biochem* 1999, 264: 258-267
- Di Marzo, V., Breivogel, CS., Tao, Q., Bridgen, DT., Razdan, RK., Zimmer, AM., Zimmer, A., Martin, BR., Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain, *J Neurochem*. 2000, 75(6):2434-44
- Di Marzo, V., Deutsch, DG., Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors, *Neurobiol Dis*. 1998, 5(6):386-404
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons, *Nature* 1994, 372: 686-691

- Di Marzo, V., Goparaju, SK., Wang, L., Liu, J., Bátakai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, GI., Palmiter, RD., Sugiura, T., Kunos, G., Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake, *Nature*. 2001, 410(6830):822-5
- Di Marzo, V., Hill, MP., Bisogno, T., Crossman, AR., Brotchie, JM., Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease, *FASEB J*. 2000, 14(10):1432-8
- Di Marzo, V., Hill, MP., Bisogno, T., Crossman, AR., Brotchie, JM., Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease, *FASEB J*. 2000, 14(10):1432-8
- Di Marzo, V., Ligresti, A., Morera, E., Nalli, M., Ortar, G., The anandamide membrane transporter. Structure-activity relationships of anandamide and oleylethanolamine analogs with phenyl rings in the polar head group region, *Bioorg Med Chem*. 2004, 12(19):5161-9
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action, *Trends Neurosci*. 1998 Dec;21(12):521-8. Review. Erratum in: *Trends Neurosci* 1999, 22(2):80
- Di Marzo, V., Melck, D., Orlando, P., Bisogno, T., Zagoory, O., Bifulco, M., Vogel, Z., De Petrocellis, L., Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells, *Biochem J*. 2001, 358(Pt 1):249-55
- Dickson, D.W., Lee, S.C., Mattiace, L.A., Yen, S.H., Brosnan, C., Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease, *Glia* 1993, 7: 75-83
- Dickson, TC., Saunders, HL., Vickers, JC., Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease, *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997, 23(6):483-91
- Dinh, TP., Freund, TF., Piomelli, D., A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation, *Chem Phys Lipids*. 2002, 121(1-2):149-58
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated review, *Trends Neurosci* 1999, 22:391-397
- Dodel, RC, Bales, KR, Farlow, MR, Gasser, T, Paul, SM, Du, Y., Rapid detection of a pentanucleotide deletion polymorphism in the human alpha2-macroglobulin gene, *Clin Chem*. 1999, 45(2):307-17
- Dodel, RC, Du, Y., Bales, KR., Ling, Z., Carvey, PM., Paul, SM., Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death, *Brain Res Mol Brain Res*. 1999, 64(1):14-8
- Dogen, M.D., Patel, S., Rudaya, A.Y., Steiner, A.A., Szekely, M., Romanovsky, A.A., Lipopolysaccharide fever is initiated via capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor, *Br J Pharmacol* 2004, 143: 1023-1032

- Du Plessis, A.J., Volpe, J.J., Perinatal brain injury in the preterm and term newborn, *Curr Opin Neurol.* 2002, 15(2):151-7
- Du Plessis, A.J., Volpe, J.J., Perinatal brain injury in the preterm and term newborn, *Curr Opin Neurol.* 2002, 15(2):151-7
- Duffy, P.E., Rapport, M., Graf, L., Glial fibrillary acidic protein and Alzheimer-type senile dementia, *Neurology* 1980, 30 : 778-782
- Dutta, S., Nandagopal, K., Gangopadhyay, P., Mukhopadhyay, K., Molecular Aspects of Down Syndrome, *Indian Pediatrics* 2005, 42: 339-344
- Egertová, M., Elphick, M.R., Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB₁, *J Comp Neurol.* 2000, 422(2):159-71
- Egertová, M., Giang, D.K., Cravatt, B.F., Elphick, M.R., A new perspective on cannabinoid signaling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB₁ receptor in rat brain, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1998, 265: 2081-2085
- Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., Klein, T., Fernandez, F., Tan, J., Shytle, R.D., Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB₂) suppresses microglial activation, *J Neuroinflammation.* 2005, 2:29
- Eissenstat, M.A., Bell, M.R., D'Ambra, T.E., Alexander, E.J., Daum, S.J., Ackerman, J.H., Gruett, M.D., Kumar, V., Estep, K.G., Olefirowicz, E.M., Aminoalkylindoles: structure-activity relationships of novel cannabinoid mimetics, *J Med Chem.* 1995, 38(16):3094-105
- Elphick, M.R., Egertová, M., The neurobiology and evolution of cannabinoid signaling, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, 356: 381-408
- Elser, W.P., Wolfe, M.S., A portrait of Alzheimer secretase-new features and familiar faces, *Science* 2001, 293: 1449-1454
- Epstein, C.J., Cox, D.R., Epstein, L.B., Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome), *Ann NY Acad Sci* 1985, 450: 157-168
- Facchinetti, F., Del Giudice, E., Furegato, S., Passarotto, M., Leon, A., Cannabinoids ablate release of TNF α in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide, *Glia* 2003, 41(2): 161-8
- Farid F. Youssef, F., Hormuzdi, S.G., Irving, A.J., Frenguelli, B.G., Cannabinoid modulation of neuronal function after oxygen/glucose deprivation in area CA1 of the rat hippocampus, *Neuropharmacology* 2007, 52: 1327-1335
- Fedorova, I., Hashimoto, A., Fecik, R.A., Hedrick, M.P., Hanus, L.O., Boger, D.L., Rice, K.C., Basile, A.S., Behavioral evidence for the interaction of oleamide with multiple neurotransmitter systems, *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 299: 332-342
- Fegley, D., Kathuria, S., Mercier, R., Li, C., Goutopoulos, A., Makriyannis, A., Piomelli, D., Anandamide transport is independent of fatty acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(23) : 8756-61

- Felder, Ch C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Rigglin, R.M., Koppen, G.A., Paul, S.M., Becker, G.W., Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide in brain and peripheral tissues of human and rat, *FEBS Letters* 1996, 393: 231-235
- Fernández-Espejo, E., Caraballo, I., de Fonseca, FR., El Banoua, F., Ferrer, B., Flores, JA., Galan-Rodriguez, B., Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism, *Neurobiol Dis.* 2005, 18(3):591-601
- Fernández-Espejo, E., Caraballo, I., Rodriguez de Fonseca, F., Ferrer, B., El Banoua, F., Flores, JA., Galan-Rodriguez, B., Experimental parkinsonism alters anandamide precursor synthesis, and functional deficits are improved by AM404: a modulator of endocannabinoid function, *Neuropsychopharmacology.* 2004, 29(6):1134-42
- Fernández-Ruiz, J., González, S., Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia, *Handb Exp Pharmacol.* 2005, (168):479-507
- Fernández-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S., Ramos, JA., Endocannabinoids and basal ganglia functionality, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002, 66(2-3):257-67
- Ferre, S., von Euler, G., Johanson, B., Fredholm, B., Fuxe, K., Stimulation of high affinity adenosine A2 receptors decrease the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes, *Proc Nat Acad Sci* 1991, 88: 7238-7241
- Ferrer, B., Asbrock, N., Kathuria, S., Piomelli, D., Giuffrida, A., Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias, *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18: 1607-1614
- Fezza, F., Bisogno, T., Minassi, A., Appendino, G., Mechoulam, R., Di Marzo, V., Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues, *FEBS Letters* 2002, 513: 294-298
- Fimiani, C., Liberty, T., Aquirre, AJ., Amin, I., Ali, N., Stefano, GB., Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1999, 57(1):23-34
- Fimiani, C., Mattocks, D., Cavani, F., Salzert, M., Deutsch, DG., Pryor, S., Bilfinger, TV., Stefano, GB., Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release, *Cell Signal.* 1999, 11(3):189-93
- Forsch Komplementarmed.* 1999, 6 (3):12-5
- Foster, RE., Kocsis, JD., Malenka, RC., Waxman, SG., Lysophosphatidyl choline-induced focal demyelination in the rabbit corpus callosum. Electron-microscopic observations, *J Neurol Sci.* 1980, 48(2):221-31
- Fowler, CJ., The pharmacology of the cannabinoid system—a question of efficacy and selectivity, *Mol Neurobiol.* 2007, 36(1):15-25

- Fox, A., Kesingland, A., Gentry, C., McNair, K., Patel, S., Urban, L., James, I., The role of central and peripheral cannabinoid 1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain, *Pain* 2001, 92:91–100
- Franklin, A., Parmentier-Batteur, S., Walter, L., Greenberg, D.A., Stella¹, N., Palmitoylethanolamide Increases after Focal Cerebral Ischemia and Potentiates Microglial Cell Motility, *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(21):7767–7775
- Freund, G., Anderson, KJ., Glutamate receptors in the cingulate cortex, hippocampus, and cerebellar vermis of alcoholics, *Alcohol Clin Exp Res.* 1999, 23(1):1-6
- Fride, E., Ginzburg, Y., Breuer, A., Bisogno, T., Di Marzo, V., Mechoulam, R., Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth, *Eur J Pharmacol* 2001, 419(2-3): 207-14
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., De Fonseca, F.R., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., Piomelli, D., Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- γ , *Nature* 2003, 425: 90-93
- Fuentes, JA., Ruiz-Gayo, M., Manzanares, J., Vela, G., Reche, I., Corchero, J., Cannabinoids as potential new analgesics, *Life Sci.* 1999, 65(6-7):675-85
- Gardiner, K., Fortna, A., Bechtel, L., Davisson, M., Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions, *Gene* 2003, 318: 137-147
- Gebremedhin, D, Lange, AR, Campbell, WB, Hillard, CJ, Harder, DR., Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current, *Am J Physiol.* 1999, 276(6 Pt 2):H2085-93
- Ghilardi, JR., Svensson, CI., Rogers, SD., Yaksh, TL., Mantyh, PW., Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia, *J Neurosci.* 2004, 24(11):2727-32
- Giang, D.K., Cravatt, B.F., Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases, *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94: 2238-2242
- Gill, E.W., Paton, W.D.M., Pertwee, R.G., Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of cannabis, *Nature* 1970, 228: 134-136
- Giuffrida, A., Beltramo, M., Piomelli, D., Mechanisms of endocannabinoid activation: biochemistry and pharmacology, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001, 298: 7-14
- Giuffrida, A., Leweke, F.M., Gerth, C.W., Schreiber, D., Koethe, D., Faulhaber, J., Klosterkotter, J., Piomelli, D., Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms, *Neuropsychopharmacology* 2004, 29(11): 2108-14

- Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D., Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum, *Nat Neurosci* 1999, 2(4): 358-63
- Giuffrida, A., Piomelli, D., The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control, *Chem Phys Lipids* 2001, 108(1-2): 151-8
- Glaser, ST., Abumrad, NA., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, KM., Deutsch, DG., Evidence against the presence of an anandamide transporter, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(7):4269-74
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.M., The pattern of neurodegeneration in huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and gabaa receptor alterations in the human basal ganglia in huntington's disease, *Neuroscience* 2000, 97: 505-519
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, RL., Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain., *Neuroscience.* 1997, 77(2):299-318
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, RL., The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease, *Neuroscience.* 2000, 97(3):505-19
- Golech, SA., McCarron, RM., Chen, Y., Bembry, J., Lenz, F., Mechoulam, R., Shohami, E., Spatz, M., Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors, *Brain Res Mol Brain Res.* 2004, 132(1):87-92
- Gómez del Pulgar, M.T., Velasco, G., Guzmán, M., The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt, *Biochem J* 2000, 347: 369-373
- Griffin, G., Wray, E.J., Tao, Q., McAllister, S.D., Rorrer, W.K., Aung, M.M., Martin, B.R., Abood, M.E., Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system, *Eur J Pharmacol* 1999, 377: 117-125
- Griffin, W., Sheng, J., Roberts, G., Mrak, R., Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution, *J Neuropathol Exp Neurol* 1995, 54: 276-281
- Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J., White, C.L., Araoz, C., Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 86: 7611-7615
- Griffin, W.S.T., Sheng, J.G., Royston, M.C., Gentleman, S.M., McKenzie, J.E., Graham, D.I., Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression, *Brain Pathol* 1998, 8: 65-72

- Griffin, WS., Stanley, LC., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, LJ., White, CL 3rd, Araoz, C., Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989, 86(19):7611-5
- Grundy RI, Rabuffetti M, BeltramoM, Cannabinoids and neuroprotection, *Mol Neurobiol* 2001, 24:29 –52
- Grundy, RI., Rabuffetti, M., Beltramo, M., Cannabinoids and neuroprotection, *Mol Neurobiol.* 2001, 24(1-3):29-51
- Grunfeld, Y., Edery, H., Psychopharmacological activity of some substances extracted from *Cannabis sativa* L (hashish), *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1969, 27(2):219-20
- Guan, X., Cravatt, B.F., Ehring, G.R., Hall, J.E., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells, *J Cell Biol* 1997, 139: 1785-1792
- Gubellini, P., Picconi, B., Bari, M., Battista, N., Calabresi, P., Centonze, D., Bernardi, G., Finazzi-Agrò, A., Maccarrone, M., Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission, *J Neurosci.* 2002, 22(16):6900-7
- Gulyas, AI., Cravatt, BF., Bracey, MH., Dinh, TP., Piomelli, D., Boschia, F., Freund, TF., Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala, *Eur J Neurosci.* 2004, 20(2):441-58
- Guzmán M., Effects on cell viability, *Handb Exp Pharmacol.* 2005, (168):627-42
- Guzman M., Neurons on cannabinoids: dead or alive?, *Br J Pharmacol.* 2003, 140(3):439-40
- Guzmán, M., Cannabinoids: potential anticancer agents, *Nat Rev Cancer.* 2003, 3(10):745-55
- Guzmán, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., Piomelli, D., Oleylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), *J Biol Chem* 2004, 279: 27849-27854
- Guzmán, M., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Control of the cell survival/death decision by cannabinoids, *J Mol Med* 2001, 78: 613-625
- Gyure, K., Durham, R., Stewart, W., Smialek, J., Troncoso, J., Intraneuronal A β -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome, *Arch Pathol Lab Med* 2001, 125:489-492
- Hájos, N., Freund TF., Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition, *Chem Phys Lipids.* 2002, 121(1-2):73-82
- Hajos, N., Kathuria, S., Dinh, T, Piomelli, D., Freund, T.F., Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus : effects of low temperature and the transport inhibitor AM404, *Eur J Neurosci* 2004, 19(11): 2991-6
- Hájos, N., Ledent, C., Freund, TF., Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus, *Neuroscience.* 2001, 106(1):1-4

- Hampson, R.E., Deadwyler, S.A., Cannabinoids, hippocampal function and memory, *Life Science* 1999, 65 (6-7):715-23
- Hamrick, SE., Ferriero, DM., The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect?, *Curr Opin Neurol.* 2003, 16(2):147-54
- Hamrick, SE., Ferriero, DM., The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect?, *Curr Opin Neurol.* 2003, 16(2):147-54
- Han, C.J., Robinson, J.K., Cannabinoid modulation of time estimation in the rat, *Behav Neurosci* 2001, 115(1): 243-6
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., 2-arachidonoylglycerol ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 3662-5
- Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R.G., Ross, R.A., Mechoulam, R., Frider, E., HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96(25):14228-33
- Head, E., Azizeh, B.Y., Lott, I.T., Tenner, A.J., Cotman, C.W., Cribbs, D.H., Complement association with neurons and beta-amyloid deposition in the brains of aged individuals with Down syndrome, *Neurobiol Dis* 2001, 8(2): 252-65
- Head, E., Lott, I., Cribbs, D., Cotman, C., Rohn, T., β -amyloid deposition and neurofibrillary tangle association with caspase activation in Down syndrome, *Neuroscience Letters* 2002, 330: 99-103
- Head, E., Lott, I., Down syndrome and beta-amyloid deposition, *Current Opinion in Neurology* 2004, 17 (2): 95-100
- Herkenham, M., Groen, B.G., Lynn, A.B., De Costa, B.R., Richfield, E.K., Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum, *Brain Res.* 1991, 552(2):301-10
- Herkenham, M., Lynn, A.B., de Costa, B.R., Richfield, E.K., Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat, *Brain Research* 1991, 547: 267-274
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., Cannabinoid receptor localization in brain, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87(5):1932-6
- Hillard, C.J., Edgemond, W.S., Jarrahian, A., Campbell, W.B., Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion, *Journal of Neurochemistry* 1997, 69: 631-638
- Hillard, C.J., Wilkison, D.M., Edgemond, W.S., Campbell, W.B., Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain, *Biochim Biophys Acta.* 1995, 1257(3):249-56
- Hollister, L.E., Actions of various marihuana derivatives in man, *Pharmacol Rev* 1971, 23(4): 349-57
- Hollister, L.E., Health aspects of cannabis, *Pharmacol Rev.* 1986, 38(1):1-20

- Howlett AC., The cannabinoid receptors, Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002, 68-69:619-31
- Howlett, AC., Breivogel, CS., Childers, SR., Deadwyler, SA., Hampson, RE., Porrino, LJ., Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress, Neuropharmacology. 2004, 47(1):345-58
- Howlett, AC., Johnson, MR., Melvin, LS., Milne, GM., Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model, Mol Pharmacol. 1988, 33(3):297-302
- Huang, S.M., Bisogno, T., Petros, T.J., Chang, S.Y., Zavitsanos, P.A., Zipkin, R.E., Sivakumar, R., Coop, A., Maeda, D.Y., De Petrocellis, L., Burstein, S., Di Marzo, V., Walker, J.M., Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain, J Biol Chem 2001, 276: 42639-42644
- Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., Miller, J.D., Davies, S.N., Geppetti, P., Walker, J.M., Di Marzo, V., An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors, Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99: 8400-8405
- Huidobro-Toro, J.P., Harris, R.A., Brain lipids that induce sleep are novel modulators of 5-hydroxytryptamine receptors, Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93: 8078-8082
- Itagaki, S., Akiyama, H., Saito, H., McGeer, P.L., Ultrastructural localization of complement membrane attack complex (MAC)-like immunoreactivity in brains of patients with Alzheimer's disease, Brain Research 1994, 645: 78-84
- Iuvone, T., Esposito, G., Esposito, R., Santamaria, R., Di Rosa, M., Izzo, AA., Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells, J Neurochem. 2004, 89(1):134-41
- Iversen, L., Cannabis and the brain, Brain 2003, 126: 1252-1270
- Iwatsubo, T., Mann, DM., Odaka, A., Suzuki, N., Ihara, Y., Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome, Ann Neurol. 1995, 37(3):294-9
- Izzo, AA., Capasso, F., Costagliola, A., Bisogno, T., Marsicano, G., Ligresti, A., Matias, I., Capasso, R., Pinto, L., Borrelli, F., Cecio, A., Lutz, B., Mascolo, N., Di Marzo, V., An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice, Gastroenterology. 2003, 125(3):765-74
- Izzo, AA., Coutts, AA., Cannabinoids and the digestive tract, Handb Exp Pharmacol. 2005, (168):573-98
- Jaggari, S.I., Hasnie, F.S., Sellaturay, S., Rice, A.S., The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain, Pain 1998, 76: 189-199

- Járai, Z., Wagner, J.A., Varga, K., Lake, K.D., Compton, D.R., Martin, B.R., Zimmer, A.M., Bonner, T.I., Buckley, N.E., Mezey, E., Razdan, R.K., Zimmer, A., Kunos, G., Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(24):14136-41
- Jordà, M.A., Verbakel, S.E., Valk, P.J., Vankan-Berkhoudt, Y.V., Maccarrone, M., Finazzi-Agrò, A., Löwenberg, B., Delwel, R., Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, *Blood*. 2002, 99(8):2786-93
- Kaminski, N.E., Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors, *Journal of Neuroimmunology* 1998, 83:124-132
- Kapoor, R., Davies, M., Blaker, P.A., Hall, S.M., Smith, K.J., Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration, *Ann Neurol*. 2003, 53(2):174-80
- Karanian, D., Brown, Q., Makriyannis, A., Kosten, T., Bahr, B., Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity, *The Journal of Neuroscience* 2005, 25 (34): 7813-7820
- Karanian, D.A., Brown, Q.B., Makriyannis, A., Bahr, B.A., Blocking cannabinoid activation of FAK and ERK1/2 compromises synaptic integrity in hippocampus, *Eur J Pharmacol* 2005, 508: 47-56
- Karava, V., Fasia, L., Siafaka-Kapadai, A., Anandamide amidohydrolase activity, released in the medium by *Tetrahymena pyriformis*. Identification and partial characterization. *FEBS Letters* 2001, 508: 327-331
- Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H., Holm, C., cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases, *J Biol Chem*. 1997, 272(43):27218-23
- Khaspekov, L.G., Brenz Verca, M.S., Frumkina, L.E., Hermann, H., Marsicano, G., Lutz, B., Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity, *Eur J Neurosci* 2004, 19(7): 1691-8
- Kins, S., Crameri, A., Evans, D.R., Hemmings, B.A., Nitsch, R.M., Gotz, J., Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice, *J Biol Chem*. 2001, 276(41):38193-200
- Klegeris, A., Bissonnette, C.J., McGeer, P.L., Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor, *Br J Pharmacol* 2003, 139(4): 775-86
- Klegeris, A., Bissonnette, C.J., McGeer, P.L., Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor, *Br J Pharmacol*. 2003, 139(4):775-86

- Klein, T.W., Lane, B., Newton, C.A., Friedman, H., The cannabinoid system and cytokine network, *P.S.E.B.M.* 2000, 225: 1-8
- Klein, T.W., Newton, C., Larsen, K., Lu, L., Perkins, I., Nong, L., Friedman, H., The cannabinoid system and immune modulation, *Journal of Leukocyte Biology* 2003, 74 (4): 486-496
- Koenigsknecht, J., Landreth, G., Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism, *J Neurosci.* 2004, 24(44):9838-46
- Koller, W., G. Herbst, D. Anderson, R. Wack, and J. Gordon., Quinpirole hydrochloride, a potential anti-parkinsonism drug, *Neuropharmacology* 1987, 26: 1031-1036
- Kolson, DL., González-Scarano, F., HIV and HIV dementia, *J Clin Invest.* 2000, 106(1):11-3
- Kolson, DL., González-Scarano, F.J., HIV and HIV dementia, *Clin Invest.* 2000, 106(1):11-3
- Kolson, DL., Lavi, E., González-Scarano, F., The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system, *Adv Virus Res.* 1998, 50:1-47
- Kolson, DL., Lavi, E., González-Scarano, F., The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system, *Adv Virus Res.* 1998, 50:1-47
- Kozak, KR., Prusakiewicz, JJ., Rowlinson, SW., Prudhomme, DR., Marnett, LJ., Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide, *Biochemistry.* 2003, 42(30):9041-9
- Kreutzberg, G.W., Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, *Trends in Neuroscience* 1996, 19(8): 312-8
- Kuehl, F.A., Jacob, T.A., Ganley, O.H., Ormond, R.E., Meisinger, M.A.P., The identification of N-2-(hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent, *J Am Chem Soc* 1957, 79: 5577-5578
- Kunos, G., Bátka, S., Offertáler, L., Mo, F., Liu, J., Karcher, J., Harvey-White, The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor, *J.Chem Phys Lipids.* 2002, 121(1-2):45-56
- Lastres-Becker, I., Berrendero, F., Lucas, JJ., Martín-Aparicio, E., Yamamoto, A., Ramos, JA., Fernández-Ruiz, JJ., Loss of mRNA levels, binding and activation of GTP-binding proteins for cannabinoid CB1 receptors in the basal ganglia of a transgenic model of Huntington's disease, *Brain Res.* 2002, 929(2):236-42
- Lastres-Becker, I., Cebeira, M., de Ceballos, ML., Zeng, BY., Jenner, P., Ramos, JA., Fernández-Ruiz, JJ., Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets, *Eur J Neurosci.* 2001, 14(11):1827-32
- Lastres-Becker, I., Gómez, M., De Miguel, R., Ramos, JA., Fernández-Ruiz, J., Loss of cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia in the late akinetic phase of rats with experimental Huntington's disease, *Neurotox Res.* 2002, 4(7-8):601-608

- Laws, S.M., Hone, E., Gandy, S., Martins, R., Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription, *J Neurochem* 2003, 84: 1215-1236
- Leggett, J.D., Aspley, S., Beckett, S.R., D'Antona, A.M., Kendall, D.A., Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors, *Br J Pharmacol.* 2004, 141(2):253-62
- Lemere, C.A., Lopera, F., Kosik, K.S., Lendon, C.L., Ossa, J., Saido, T.C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapié, L., Arango, J.C., Anthony, D.C., Koo, E.H., Goate, A.M., Selkoe, D.J., Arango, J.C., The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A β 42 deposition and severe cerebellar pathology, *Nat Med.* 1996, 2(10):1146-50
- Leverenz, J.B., Raskind, M.A., Early amyloid deposition in the medial temporal lobe of young Down syndrome patients: a regional quantitative analysis, *Exp Neurol* 1998, 150: 296-304
- Lichtman, A.H., Hawkins, E.G., Griffin, G., Cravatt, B.F., Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo, *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 302: 73-79
- López-Rodríguez, M.L., Viso, A., Ortega-Gutiérrez, S., Fowler, C., Tiger, G., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J., Ramos, J.A., Design, synthesis and biological evaluation of new endocannabinoid transporter inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003, 38: 403-412
- Lott, I., Head, E., Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis, *Neurobiology of Aging* 2005, 26: 383-389
- Ludolph, A.C., Treatment of amyotrophic lateral sclerosis--what is the next step?, *J Neurol.* 2000, 247:13-8
- Ludolph, A.C., Treatment of amyotrophic lateral sclerosis--what is the next step?, *J Neurol.* 2000, 247:13-8
- Lue, L.F., Brachova, L., Civin, W.H., Rogers, J., Inflammation, A β deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration, *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996, 55(10):1083-8
- Lyman, W.D., Abrams, G.A., Raine, C.S., Experimental autoimmune encephalomyelitis: isolation and characterization of inflammatory cells from the central nervous system, *J Neuroimmunol.* 1989, 25(2-3):195-201
- Maccarrone, M., Bari, M., Menichelli, A., Del Principe, D., Agró, F., Anandamide activates human platelets through a pathway independent of the arachidonic cascade, *FEBS Letters* 1999, 447: 277-282
- Maccarrone, M., Bari, M., Menichelli, A., Giuliani, E., del Principe, D., Finazzi-Agró, A., Human platelets bind and degrade 2-arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor, *European Journal of Biochemistry* 2001, 268: 819-825

- Maccarrone, M., De Felici, M., Bari, M., Klinger, F., Siracusa, G., Finazzi-Agró, A., Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones, *Eur J Biochem* 2000b, 267: 2991-2997
- Maccarrone, M., Gubellini, P., Bari, M., Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism, *Journal of Neurochemistry* 2003, 85 : 1018-1025
- Maccarrone, M., van der Stelt, M., Rossi, A., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Finazzi-Agró, A., Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain, *J Biol Chem* 1998, 273: 32332-32339
- Mackie, K., Hille, B., Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 3825-9
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, JJ., Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons, *Neurosci Lett.* 1992, 148(1-2):173-6
- Malan, TP. Jr, Ibrahim, MM., Deng, H., Liu, Q., Mata, HP., Vanderah, T., Porreca, F., Makriyannis, A., CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception., *Pain.* 2001, 93(3):239-45
- Malfait, A.M., Gallily, R., Sumariwalla, P.F., Malik, A.S., Andreaskos, E., Mechoulam, R., Feldmann, M., The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induce arthritis, *Proc Natl Acad Sci* 2000, 97: 9561-9566
- Maneuf, Y. P., A. R. Crossman, and J. M. Brotchie., The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2 but not D1, dopamine receptor mediated alleviation of akinesia in the reserpine treated rat model of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 1997, 148: 265-270
- Maneuf, Y. P., and J. M. Brotchie., Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices, *Br. J. Pharmacol.* 1997, 120: 1397-1398
- Manno, J.E., Kiplinger, G.F., Haine, S.E., Bennet. I.F., Forney, R.B., Comparative effects of smoking marihuana or placebo on human motor and mental performance, *Clin Pharmacol Ther* 1970, 11(6): 808-15
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutierrez, S.O., van der Stelt, M., López-Rodríguez, M.L., Casanova, E., Schutz, G., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., Behl, C., Lutz, B., CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity, *Science* 2003, 302(5642): 84-8
- Marsicano, G., Lutz, B., Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain, *Eur J Neurosci* 1999, 11(12): 4213-25
- Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B., Behl, C., Neurprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1, *J Neurochem* 2002, 80(3): 448-56

- Martínez-Orgado J, Fernández-Frutos B, González Romero E, Uriguen L, Romero J, Viveros MP, Neuroprotection by the cannabinoid agonist WIN-55212 in an vivo newborn rat model of acute severe asphyxia, *Brain Res Mol Brain Res* 2003, 1141:32–139
- Martínez-Orgado, J., Fernández-Frutos, B., González, R., Romero, E., Urigüen, L., Romero, J., Viveros, MP., Neuroprotection by the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vivo newborn rat model of acute severe asphyxia, *Brain Res Mol Brain Res*. 2003, 114(2):132-9
- Massa, F., Marsicano, G., Hermann, H., Cannich, A., Monory, K., Cravatt, BF., Ferri, GL., Sibaev, A., Storr, M., Lutz, B., The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation, *J Clin Invest*. 2004, 113(8):1202-9
- Mattes, R.D., Engelman, K., Shaw, L.M., Elsohly, M.A., Cannabinoids and appetite stimulation, *Pharmacol Biochem Behav* 1994, 49(1): 187-95
- Maurelli, S., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Di Luccia, A., Marino, G., Di Marzo, V., Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase', *FEBS Lett*. 1995, 377(1):82-6
- Mayeux, R., Honig, LS., Tang, MX., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N., Mehta, PD., Plasma A[β]₄₀ and A[β]₄₂ and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk, *Neurology*. 2003, 61(9):1185-90
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Tago, H., McGeer, E.G., Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR, *Neuroscience Letters* 1987, 79: 195-200
- McGeer, P.L., Rogers, J., Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease, *Neurology* 1992, 42(2): 447-9
- McGeer, P.L., Schulzer, M., McGeer, E.G., Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies, *Neurology* 1996, 47: 425-432
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochem Pharmacol* 1995, 50: 83-90
- Mechoulam, R., Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002, 66(2-3):93-9
- Mechoulam, R., Hanus, L., Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects, *Chem Phys Lipids*. 2002, 121(1-2):35-43
- Mechoulam, R., Lichtman, AH., Neuroscience. Stout guards of the central nervous system, *Science* 2003, 302(5642):65-7
- Mechoulam, R., Marijuana chemistry, *Science*. 1970, 168(936):1159-66

- Mechoulam, R., Panikashvili, D., Shohami, E., Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications, *Trends Mol Med.* 2002, 8(2):58-61
- Mechoulam, R., Panikashvili, D., Shohami, E., Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications, *Trends Mol Med.* 2002, 8(2):58-61
- Mechoulam, R., Parker, LA., Gallily, R., Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects, *J Clin Pharmacol.* 2002, 42(11 Suppl):11S-19S
- Mechoulam, R., Spatz, M., Shohami, E., Endocannabinoids and neuroprotection, *Sci STKE.* 2002, (129):RE5
- Mestre, L., Correa, F., Docagne, F., Clemente, D., Guaza, C., The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 increases COX-2 expression and PGE2 release in murine brain-derived endothelial cells following Theiler's virus infection, *Biochem Pharmacol.*, 72(7):869-80
- Mestre, L., Correa, F., Docagne, F., Clemente, D., Ortega-Gutiérrez, S., Arévalo-Martín, A., Molina-Holgado, E., Borrell, J., Guaza, C., Cannabinoid system and neuroinflammation: therapeutic perspectives in multiple sclerosis, *Rev Neurol.* 2006, 43(9):541-8
- Mezey, E., Tóth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R.A. G., Blumberg, P.M., Szallasi, A., Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, 97: 3655-3660
- Mikuriya, TH., Aldrich, MR., Cannabis 1988. Old drug, new dangers. The potency question., *J Psychoactive Drugs.* 1988, 20(1):47-55
- Mikuriya, TH., Marijuana in medicine: past, present and future, *Calif Med.* 1969, 110(1):34-40
- Milton, NG., Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide, *Neurosci Lett.* 2002, 332(2):127-30
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M., Eisdorfer, C., The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis, *J Neurol Sci.* 2002, 202(1-2):13-23
- Minagar, A., Sheremata, WA., Weiner, WJ., Transient movement disorders and multiple sclerosis, *Parkinsonism Relat Disord.* 2002, 9(2):111-3
- Mitchison, T.J., Cramer, L.P., Actin-based cell motility and cell locomotion, *Cell* 1996, 84(3): 371-9
- Moldrich, G., Wenger T., Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study, *Peptides* 2000, 21:1735-1742
- Moldrich, G., Wenger, T., Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study, *Peptides* 2000, 21(11): 1735-42

- Molina-Holgado, E., Vela, JM., Arévalo-Martín, A., Guaza, C., LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10, *Eur J Neurosci.* 2001, 13(3):493-502
- Molina-Holgado, F., Grencis, R., Rothwell, NJ., Actions of exogenous and endogenous IL-10 on glial responses to bacterial LPS/cytokines, *Glia.* 2001, 33(2):97-106
- Molina-Holgado, F., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Rothwell, N.J., Role of the CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures, *J Neurosci Res* 2002, 67: 829-836
- Morgese, M.G., Cassano, T., Cuomo, V., Giuffrida, A., Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB1 and TRPV1 receptors, *Experimental Neurology* 2007, 208: 110-119
- Muccioli, GG., Xu, C., Odah, E., Cudaback, E., Cisneros, JA., Lambert, DM., López Rodríguez, ML., Bajjalieh, S., Stella, N., Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells, *J Neurosci.* 2007, 27(11):2883-9
- Muller-Vahl, K.R., Schneider, U., Emrich, H.M., Nabilone increases choreatic movements in Huntington's disease, *Mov Disord* 1999, 14: 1038-1040
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 1993, 365(6441): 61-5
- Murillo-Rodríguez, E., Vázquez, E., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Drucker-Colin, R., Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on the sleep-wake cycle, c-Fos expression and dopamine levels of the rat, *Eur J Pharmacol.* 2007, 562(1-2):82-91
- Myers, R.D., Lopez-Valpuesta, F.J., Minano, F.J., Wooten, M., Barwick, V.S., Wolpe, S.D., Fever and feeding in the rat: actions of intrahypothalamic interleukin-6 compared to macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), *J Neurosci Res* 1994, 39: 31-37
- Nagahira, A., Nagahira, K., Murafuji, H., Abe, K., Magota, K., Matsui, M., Oikawa, S., Identification of a novel inhibitor of LPS-induced TNF- α production with antiproliferative activity in monocyte/macrophages, *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 281(4):1030-6
- Nagayama, T., Sinor, A.D., Simon, R.P., Chen, J., Graham, S.H., Jin, K., Greenberg, D.A., Cannabinoids and Neuroprotection in Global and Focal Cerebral Ischemia and in Neuronal Cultures, *The Journal of Neuroscience* 1999, 19(8):2987-2995
- Neurobiol Dis.* 1998, 5(6B):462-73
- Newell, GR., Mansell, PW., Wilson, MB., Lynch, HK., Spitz, MR., Hersch, EM., Risk factor analysis among men referred for possible acquired immune deficiency syndrome, *Prev Med.*, 14(1):81-91
- Nicholson, K., Pain, cognition and traumatic brain injury, *NeuroRehabilitation.* 2000, 14(2):95-103
- Nicholson, SJ., Witherden, AS., Hafezparast, M., Martin, JE., Fisher, EM., Mice, the motor system, and human motor neuron pathology, *Mamm Genome.* 2000, 11(12):1041-52

- Notcutt, W., Price, M., Miller, R., Newport, S., Phillips, C., Simmons, S., Sansom, C., Initial experiences with medicinal extracts of cannabis for chronic pain: results from 34 'N of 1' studies, *Anaesthesia*. 2004, 59(5):440-52
- Núñez, E., Benito, C., Pazos, MR., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, RM., Romero, J., Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study, *Synapse*. 2004, 53(4):208-13
- Núñez, E., Benito, C., Tolón, R.M., Hillard, C., Griffin, W.S., Romero, J., Glial expression of cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome, *Neuroscience* 2008, 151(1): 104-10
- Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M., Marin, C., Alonso, F., Zamarbide, I., Lanciego, J.L., Rodríguez-Díaz, M., The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits, *Neurology* 2004, 62: S17-S30
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J., Murphy, P., Golde, T., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M., Akbari, Y., LaFerla, F., Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction, *Neuron* 2003, 39: 409-421
- Offertáler, L., Mo, FM., Bátka, S., Liu, J., Begg, M., Razdan, RK., Martin, BR., Bukoski, RD., Kunos, G., Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor, *Mol Pharmacol*. 2003, 63(3):699-705
- Ortar, G., Ligresti, A., De Petrocellis, L., Morera, E., Di Marzo, V., Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake, *Biochem Pharmacol* 2003, 65: 1473-1481
- Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures, *Glia*. 2005, 52(2):163-8
- Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation, *FASEB J*. 2006, 20(13):2405-7
- Parmentier-Batteur, S., Jin, K., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A., Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice, *J Neurosci* 2002, 22(22): 9771-5
- Patel, S., Hillard, C.J., Cannabinoid CB1 receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice, *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 297 (2): 629-37
- Patel, S., Hillard, C.J., Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice, *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 297(2):629-37
- Pazos, MR., Núñez, E., Benito, C., Tolón, RM., Romero, J., Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives, *Life Sci*. 2004, 75(16):1907-15
- Pearson, T., Currie, A.J., Etherington, L.A., Gadalla, A.E., Damian, K., Llaudet, E., Dale, N., Frenguelli, B.G., Plasticity of purine release during cerebral ischemia: clinical implications?, *J. Cell. Mol. Med*. 2003, 7: 362-375

- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R., Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?, *TINS* 1999, 22-6: 273-280
- Pertwee, R.G., Cannabinoid pharmacology: the first 66 years, *British Journal of Pharmacology* 2006, 147: S163-S171
- Pertwee, R.G., The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids, *The AAPS Journal* 2005, 7 (3): 625-654
- Pertwee, R.G., Cannabinoid receptors and pain, *Prog Neurobiol.* 2001, 63(5):569-611
- Pertwee, R.G., Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use.
- Pertwee, R.G., Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors, *Pharmacol Ther.* 1997, 74(2):129-80
- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M., Klein, P.S., GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides, *Nature.* 2003, 423(6938):435-9
- Piomelli, D., Beltramo, M., Giuffrida, A., Stella N., Endogenous cannabinoid signaling.
- Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S.Y., Goutopoulos, A., Xie, X-Q, Makriyannis, A., Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 5802-5807
- Pitt, D., Werner, P., Raine, C.S., Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis, *Nat Med.* 2000, 6(1):67-70
- Porter, A.C., Sauer, J.M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B., Felder, C.C., Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor, *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 301: 1020-1024
- Pryce, G., Ahmed, Z., Hankey, D., Jackson, S., Croxford, J.L., Pocock, J., Ledent, C., Petzold, A., Thompson, A., Giovannoni, G., Cuzner, M.L., Baker, D., Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis, *Brain* 2003, 126: 2191-2202
- Puffenbarger, R.A., Kapulina, O., Howell, J.M., Deutsch, D.G., Characterization of the 5'-sequence of the mouse fatty acid amide hydrolase, *Neuroscience Letters* 2001, 314: 21-24
- Puffenbarger, R.A., Kapulina, O., Howell, J.M., Deutsch, D.G., Characterization of the 5'-sequence of the mouse fatty acid amide hydrolase, *Neurosci Lett.* 2001, 314(1-2):21-4
- Raman, C., McAllister, S.D., Rizvi, G., Patel, S.G., Moore, D.H., Abood, M.E., Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2004, 5(1):33-9
- Ramírez, B.G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., de Ceballos, M.L., Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation, *J Neurosci.* 2005, 25(8):1904-13
- Richfield, E.K., Herkenham, M., Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann. Neurol.* 1994, 36:577-584

- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Alonso, R., Shire, D., Congy, C., Soubrié, P., Brelière, JC., Le Fur, G., Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist, *Life Sci.* 1995, 56(23-24):1941-7
- Rinaldi-Carmona, M., Le Duigou, A., Oustric, D., Barth, F., Bouaboula, M., Carayon, P., Casellas, P., Le Fur, G., Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system, *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 287(3):1038-47
- Robberecht, W., Genetic markers of ALS, Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000, 1 Suppl 2:S57-9
- Robberecht, W., Van Den Bosch, L., Vleminckx, V., Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis, *Acta Neurol Belg.* 2000, 100(3):181-7
- Robson, AJ., Rousseau, K., Loudon, AS., Ebling, FJ., Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents, *J Neuroendocrinol.* 2002, 14(9):697-709
- Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gómez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., Murillo-Rodríguez, E., Giuffrida, A., Loverme, J., Gaetani, S., Kathuria, S., Gall, C., Piomelli, D., An anorexic lipid mediator regulated by feeding, *Nature* 2001, 414: 209-212
- Rogers, J., Lubner, J., Styren, S.D., Civin, W.H., Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 1988, 9: 339-349
- Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, CJ., Li, R., Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide, *Glia.* 2002, 40(2):260-9
- Romero, J., Berrendero, F., García-Gil, L., Ramos, JA., Fernández-Ruiz, JJ., Cannabinoid receptor and WIN-55,212-2-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding and cannabinoid receptor mRNA levels in the basal ganglia and the cerebellum of adult male rats chronically exposed to delta 9-tetrahydrocannabinol, *J Mol Neurosci.* 1998, 11(2):109-19
- Romero, J., Berrendero, F., Pérez-Rosado, A., Manzanares, J., Rojo, A., Fernández-Ruiz, JJ., de Yebenes, JG., Ramos, JA., Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen, *Life Sci.* 2000, 66(6):485-94
- Romero, J., de Miguel, R., García-Palomero, E., Fernández-Ruiz, JJ., Ramos, JA., Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function, *Brain Res.* 1995, 694(1-2):223-32
- Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, JJ., Ramos, JA., The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons, *Life Sci.* 1995, 6(23-24):2033-40

- Romero, J., García, L., Fernández-Ruiz, JJ., Cebeira, M., Ramos, JA., Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to delta 9-tetrahydrocannabinol, *Pharmacol Biochem Behav.* 1995, 51(4):731-7
- Romero, J., García-Palomero, E., Fernández-Ruiz, JJ., Ramos, JA., Involvement of GABA(B) receptors in the motor inhibition produced by agonists of brain cannabinoid receptors, *Behav Pharmacol.* 1996, 7(3):299-302
- Romero, J., Hillard, C.J., Calero, M., Rábano, A., Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study, *Molecular Brain Research* 2002, 100(1-2): 85-93
- Ross, R.A., Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 2003, 140: 790-801
- Ross, RA., Coutts, AA., McFarlane, SM., Anavi-Goffer, S., Irving, AJ., Pertwee, RG., MacEwan, D.J., Scott, RH., Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception, *Neuropharmacology.* 2001, 40(2):221-32
- Rossi, F., Bianchini, E., Synergistic induction of nitric oxide by β -amyloid and cytokines in astrocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 225: 474-478
- Roth, M., Tashkin, D., Whittaker, K., Choi, R., Baldwin, G., Tetrahydrocannabinol suppresses immune function and enhances HIV replication in the huPBL-SCID mouse, *Life Sciences* 2005, 77: 1711-1722
- Roth, S.H., Stereospecific presynaptic inhibitory effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on cholinergic transmission in the myenteric plexus of the guinea pig, *Can J Physiol Pharmacol* 1978, 56: 968-75
- Russo, E., Guy, GW., A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol, *Med Hypotheses.* 2006, 66(2):234-46
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., Huang, T.T., Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 6256-6261
- Samson, MT., Small-Howard, A., Shimoda, LM., Koblan-Huberson, M., Stokes, AJ., Turner, H., Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells, *J Immunol.* 2003, 170(10):4953-62
- Sánchez, C., de Ceballos, M.L., Gómez del Pulgar, T., Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor, *Cancer Research* 2001, 61: 5784-5789
- Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Delta-9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells, *FEBS Letters* 1998, 436: 6-10
- Sancho, R., Macho, A., De la Vega, L., Calzado, M.A., Fiebich, B.L., Appendino, G., Muñoz, E., Immunosuppressive activity of endovanilloids N-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of NF- κ B NFAT, and activator protein I signaling pathways, *Journal of Immunology* 2004, 172: 2341-2351

- Sañudo-Peña, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernández-Ruiz, J.J., Walker, J.M., Activational role of cannabinoids on movement, *Eur J Pharmacol* 2000, 391(3): 269-74
- Sañudo-Peña, M.C., Tsou, K., Walker, J.M., Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei, *Life Science* 1999, 65(6-7): 703-13
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, DK., Lynch, KR., Cheng, R., Heng, HH., George, SR., O'Dowd, BF., Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain, *Brain Res Mol Brain Res.* 1999, 64(2):193-8
- Schliker, E., Kathmann, M., Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors, *Trends Pharmacol Sci* 2001, 22: 565-72
- Schmid, P.C., Schwartz, K.D., Smith, C.N., Krebsbach, R.J., Berdyshev, E.V., Schmid, H.H., A sensitive endocannabinoid assay The simultaneous analysis of N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols, *Chem. Phys. Lipids* 2000, 104: 185-191
- Schwarz, H., Blanco, FJ., Lotz, M., Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis, *J Neuroimmunol.* 1994, 55(1):107-15
- Selkoe, D.J., Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature* 1999, 399, supp-A23-A31
- Shaffer, LM., Dority, MD., Gupta-Bansal, R., Frederickson, RC., Younkin, SG., Brunden, KR., Amyloid beta protein (A beta) removal by neuroglial cells in culture, *Neurobiol Aging.* 1995, 16(5):737-45
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA, Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures, *J Neurosci* 1996, 16:4322-4334
- Sheng, JG., Jones, RA., Zhou, XQ., McGinness, JM., Van Eldik, LJ., Mrak, RE., Griffin, WS., Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation, *Neurochem Int.* 2001, 39(5-6):341-8
- Shmist, YA., Goncharov, I., Eichler, M., Shneyvays, V., Isaac, A., Vogel, Z., Shainberg, A., Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production, *Mol Cell Biochem.* 2006, 283(1-2):75-83
- Shohami, E., Gallily, R., Mechoulam, R., Bass, R., Ben-Hur, T., Cytokine production in the brain following closed head injury: dexamabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant, *J Neuroimmunol.* 1997, 72(2):169-77
- Shohami, E., Gallily, R., Mechoulam, R., Bass, R., Ben-Hur, T., Cytokine production in the brain following closed head injury: dexamabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant, *J Neuroimmunol.* 1997, 72(2):169-77

- Sieradzan, K.A., Fox, S.H., Hill, M., Dick, J.P.R., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study., *Neurology* 2001, 57, 2108–2111
- Silverdale, M.A., McGuire, S., McInnes, A., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., Striatal Cannabinoid CB1 Receptor mRNA Expression Is Decreased in the Reserpine-Treated Rat Model of Parkinson's Disease, *Experimental Neurology* 2001, 169: 400–406
- Silverdale, M.A., McGuire, S., McInnes, A., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., Striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression is decreased in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease, *Exp Neurol.* 2001, 169(2):400–6
- Sinha, S.K., Singh, J., Newer concepts and approaches to neonatal brain asphyxia, *Indian J Pediatr.* 1998, 65(1):55–62
- Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., Leon, A., The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93(9):3984–9
- Smith S.R., Terminelli C., Denhardt G., Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice, *J Pharmacol Exp Ther.* 2000, 293:136–150
- Smith, S.S., Annaert, W., Kim, S.H., De Strooper, B., β -Secretase: never more enigmatic, *TINS* 2001, 24: 2–6
- Stefano, G.B., Endocannabinoid immune and vascular signaling, *Acta Pharmacol Sin* 2000, 21: 1071–1081
- Stefano, G.B., Liu, Y., Goligorsky, M.S., Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes, *J Biol Chem.* 1996, 271(32):19238–42
- Stefano, G.B., Salzet, M., Bilfinger, T.V., Long-term exposure of human blood vessels to HIV gp120, morphine, and anandamide increases endothelial adhesion of monocytes: uncoupling of nitric oxide release, *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998, 31(6):862–8
- Steffens, M., Huppertz, H.J., Zentner, J., Chauzit, E., Feuerstein, T.J., Unchanged glutamine synthetase activity and increased NMDA receptor density in epileptic human neocortex: implications for the pathophysiology of epilepsy, *Neurochem Int.* 2005, 47(6):379–84
- Stence, N., Waite, M., Dailey, M.E., Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices, *Glia* 2001, 33(3): 256–66
- Stoltzner, S.E., Grenfell, T.J., Mori, C., Wisniewski, T.M., Selkoe, D.J., Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease, *Am J Pathol* 2000, 156(2): 489–99
- Streit, W.J., Mrak, R.E., Griffin, W.S., Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective, *J Neuroinflammation.* 2004, 1(1):14

- Styren, S.D., Civin, W.H., Rogers, J., Molecular, cellular, and pathologic characterization of HLA-DR immunoreactivity in normal elderly and Alzheimer's disease brain, *Exp Neurol* 1990, 110: 93-104
- Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., Gokoh, M., Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, *Prog Lipid Res.* 2006, 45(5):405-46
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain, *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 215: 89-97
- Sugiura, T., Waku, K., Cannabinoid receptors and their endogenous ligands, *J Biochem.* 2002, 132(1):7-12
- Svensson, CI., Yaksh, TL., The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002, 42:553-83
- Thomas, E.A., Cravatt, B.F., Danielson, P.E., Gilula, N.B., Sutcliffe, J.G., Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system, *Journal Neuroscience Research* 1997, 50: 1047-1052
- Tindall, B., Philpot, C.R., Cooper, D.A., Gold, J., Donovan, B., Penny, R., Barnes, T., The Sydney AIDS project: development of acquired immunodeficiency syndrome in a group of HIV seropositive homosexual men, *Australia and New Zealand Journal of Medicine* 1988, 18: 8-15
- Toth, A., Boczan, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L., Blumberg, P.M., Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005: 135, 162-168
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, MC., Mackie, K., Walker, JM., Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system, *Neuroscience.* 1998, 83(2):393-411
- Tsou, K., Mackie, K., Sañudo-Peña, MC., Walker, JM., Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation, *Neuroscience.* 1999, 93(3):969-75
- Valenzano, KJ., Tafesse, L., Lee, G., Harrison, JE., Boulet, JM., Gottshall, SL., Mark, L., Pearson, MS., Miller, W., Shan, S., Rabadi, L., Rotshteyn, Y., Chaffer, SM., Turchin, PI., Elsemore, DA., Toth, M., Koetzner, L., Whiteside, GT., Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy, *Neuropharmacology.* 2005, 48(5):658-72
- Valverde, O., Ledent, C., Beslot, F., Parmentier, M., Roques, BP., Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors, *Eur J Neurosci.* 2000, 12(2):533-9

- Van der Stelt, M., Fox, S.H., Hill, M., Crossman, A.R., Petrosino, S., Di Marzo, V., Brotchie, J.M., A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned nonhuman primate models of Parkinson's disease, *FASEB J.* 2005, 19: 1140–1142
- Van der Stelt, M., Mazzola, C., Esposito, G., Matias, I., Petrosino, S., De Filippis, D., Micale, V., Steardo, L., Drago, F., Iuvone, T., Di Marzo, V., Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels, *Cell Mol Life Sci.* 2006, 63(12):1410–24
- Van der Stelt, M., Veldhuis, WB., Bär PR., Veldink, GA., Vliegthart, JF., Nicolay, K., Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity, *J Neurosci.* 2001, 21(17):6475–9
- Van der Stelt, M., Veldhuis, WB., van Haaften, GW., Fezza, F., Bisogno, T., Bar, PR., Veldink, GA., Vliegthart, JF., Di Marzo, V., Nicolay, K., Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo, *J Neurosci.* 2001, 21(22):8765–71
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors, *Science* 2005, 310:329–332
- Vaney, C., Heinzl-Gutenbrunner, M., Jobin, P., Tschopp, F., Gattlen, B., Hagen, U., Schnelle, M., Reif, M., Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study, *Mult Scler.* 2004, 10(4):417–24
- Vaney, C., Heinzl-Gutenbrunner, M., Jobin, P., Tschopp, F., Gattlen, B., Hagen, U., Schnelle, M., Reif, M., Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study, *Mult Scler.* 2004, 10(4):417–24
- Velasco, G., Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Blázquez, C., Guzmán, M., Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas?, *Neuropharmacology.* 2004, 47(3):315–23
- Volicer, L., Stelly, M., Morris, J., McLaughlin, J., Volicer, BJ., Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease, *Int J Geriatr Psychiatry.* 1997, 12(9):913–9
- Wade, DT., Makela, P., Robson, P., House, H., Bateman, C., Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients, *Mult Scler.* 2004, 10(4):434–41
- Wade, DT., Robson, P., House, H., Makela, P., A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms, *Aram J.Clin Rehabil.* 2003, 17(1):21–9

- Waksman, Y., Olson, JM., Carlisle, SJ., Cabral, GA., The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells, *J Pharmacol Exp Ther.* 1999, 288(3):1357-66
- Waleh, N.S., Cravatt, B.F., Apte-Deshpande, A., Terao, A., Kilduff, T.S., Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene, *Gene* 2002, 291: 203-210
- Walter, L., Frankiln, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., Stella, N., Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration, *The Journal of Neuroscience* 2003, 23 (4): 1398-1405
- Walter, L., Stella, N., Cannabinoids and neuroinflammation, *Br J Pharmacol.* 2004, 141(5):775-85
- Walter, L., Stella, N., Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes, *Glia.* 2003, 44(1):85-90
- Walther, S., Mahlberg, R., Eichmann, U., Kunz, D., Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia, *Psychopharmacology (Berl).* 2006, 185(4):524-8
- Watanabe, N., Mitchison, T.J., Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia, *Science* 2002, 295(5557): 1083-6
- Weber, JT., Calcium homeostasis following traumatic neuronal injury, *Curr Neurovasc Res.* 2004, 1(2):151-71
- Weber, R., Christen, L., Christen, S., Tschopp, S., Znoj, H., Schneider, C., Schmitt, J., Opravil, M., Günthard, HF., Ledergerber, B., Effect of individual cognitive behaviour intervention on adherence to antiretroviral therapy: prospective randomized trial. Swiss HIV Cohort Study, *Antivir Ther.* 2004, 9(1):85-95
- Welch, SP., Huffman, JW., Lowe, J., Differential blockade of the antinociceptive effects of centrally administered cannabinoids by SR141716A, *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 286(3):1301-8
- Werner, P., Pitt, D., Raine, CS., Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage, *Ann Neurol.* 2001, 50(2):169-80
- Westlake, TM., Howlett, AC., Bonner, TI., Matsuda, LA., Herkenham, M., Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains, *Neuroscience.* 1994, 63(3):637-52
- Williams, KC., Corey, S., Westmoreland, SV., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., Alvarez, X., Lackner, AA., Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS, *J Exp Med.* 2001, 193(8):905-15
- Williams, KC., Corey, S., Westmoreland, SV., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., Alvarez, X., Lackner, AA., Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by

- simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS, *J Exp Med.* 2001, 193(8):905-15
- Williams, KC., Hickey, WF., Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS, *Annu Rev Neurosci.* 2002, 25:537-62
- Williams, KC., Hickey, WF., Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS, *Annu Rev Neurosci.* 2002, 25:537-62
- Wirguin I, Mechoulam R, Breuer A, Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids., *Immunopharmacology* 1994, 28:209-214
- Wisniewski, T.M., Wisniewski, H., Wen, G., Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome, *Ann Neurol* 1985, 17: 278-82
- Worley, PF., Baraban, JM., De Souza, EB., Snyder, SH., Mapping second messenger systems in the brain: differential localizations of adenylate cyclase and protein kinase C, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986, 83(11):4053-7
- Wujek, J.R., Bjartmar, C., Richer, E., Ransohoff, R.M., Yu, M., Tuohy, V.K., Trapp, B.D., Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis, *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, 61(1): 23-32
- Wyss-Coray, T., Loike, JD., Brionne, TC., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, SC., Husemann, J., Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ, *Nat Med.* 2003, 9(4):453-7
- Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, IP., Naylor, A., Bountra, C., Banati, RR., Anand, P., COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord, *BMC Neurol.* 2006,6:12
- Yost, C.S., Hampson, A.J., Leonoudakis, D., Koblin, D.D., Bornheim, L.M., Gray, A.T., Oleamide potentiates benzodizepine-sensitive gamma-aminobutyric acid receptor activity but does not alter minimum alveolar anesthetic concentration, *Anesth Analg* 1998, 86: 1294-1300
- Yrjȧnheikki, J., Tikka, T., Keinȧnen, R., Goldsteins, G., Chan, PH., Koistinaho, J., A tetracyclic derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:13496-13500
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A., Thompson, A., Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial, *Lancet.* 2003, 362(9395):1517-26
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A., Thompson, A., Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial, *Lancet.* 2003, 362(9395):1517-26

Zhu, P.J., Krnjevic, K., Persistent block of CA1 synaptic function by prolonged hypoxia, *Neuroscience* 1999, 90: 759-770

Zhu, W., Friedman, H., Klein, T.W., Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998, 286: 1103-1109

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., Bonner, T.I., Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:5780-5785

Zuardi, A., History of cannabis as a medicine:a review, *Rev Bras Psiquiatr* 2006, 28 (2): 153-157